Aus dem Anatomischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Prof. Dr. med. W. Graumann

AUTORADIOGRAPHISCHER NACHWEIS DER SPEZIFISCHEN BINDUNG VON 3H-DIHYDROTESTOSTERON UND 3H-ÖSTRADIOL IM NEBENHODEN DER MAUS UND IHRE LOKALISATION IN EINEM MOSAIK AUS ANDROGEN INSENSITIVEN UND NORMALEN ZELLEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Gunter Schleicher
aus Stuttgart

1984

UNIV.
LEIDEN
ZOOL.

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Prof. Dr. med. W. Graumann

AUTORADIOGRAPHISCHER NACHWEIS DER SPEZIFISCHEN BINDUNG VON 3H-DIHYDROTESTOSTERON UND 3H-ÖSTRADIOL IM NEBENHODEN DER MAUS UND IHRE LOKALISATION IN EINEM MOSAIK AUS ANDROGEN INSENSITIVEN UND NORMALEN ZELLEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Gunter Schleicher
aus Stuttgart

1984

Dekan: Prof. Dr. med. G. Fichtner
1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. U. Drews
2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. K. Eisele

Danksagung:

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Drews für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit, Herrn Prof. Dr. Stumpf für die Betreuung während des Experimentes und den Mitarbeitern beider Laboratorien für Anregungen und Unterstützung recht herzlich danken.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1	Anatomie des Nebenhodens	1
1.2	Funktion des Nebenhodens	4
1.3	Androgenabhängigkeit des Nebenhodens	5
1.4	Modell zum Wirkungsmechanismus von Steroidhormonen	6
1.5	Östradiol in männlichen Sexualorganen	6
1.6	Die Tfm-Mutation der Maus	6
1.7	Der Sxr-Faktor der Maus	7
1.8	Geschlechtsumgekehrte, für die Tfm-Mutation heterozygote Mäuse	7
1.9	Autoradiographische Darstellung von Steroidbindung in Gewebeschnitten	8
1.10	Ziel der Arbeit	10

Inhaltsverzeichnis Fortsetzung:

		Seite
2.	Material und Methode	11
2.1	Tiere	11
2.2	Kastration	12
2.3	Injektion	12
2.4	Präparation und Einfrieren des Gewebes	13
2.5	Befilmen der Objektträger	14
2.6	Schneiden	14
2.7	Entwicklung und Färbung	15
3.	Ergebnisse	16
3.1	Segmenteinteilung des Nebenhodens und Auswertung	16
3.1.1	Segmenteinteilung	16
3.1.2	Beurteilungskriterien bei der Auswertung der Autoradiographien	17

Inhaltsverzeichnis Fortsetzung:

		Seite
3.2	^{3}H-DHT und ^{3}H-Östradiolbindung im Epithel des Nebenhodens	17
3.2.1	Ductulus efferens	17
3.2.2	Segment 1 (Initialsegment)	18
3.2.3	Segmente 2 bis 4 (Distaler Teil des Nebenhodenkopfes)	19
3.2.4	Segmente 5 und 6 (Corpus epididymidis)	20
3.2.5	Segmente 7 bis 9 (Cauda epididymidis und Übergang in den Ductus deferens)	20
3.2.6	Ductus deferens	21
3.3	^{3}H-DHT-Bindung und ^{3}H-Östradiol-bindung im Bindegewebe des Neben-hodens	22
3.4	Kompetitionsexperimente	23
3.5	^{3}H-DHT- und ^{3}H-Östradiolbindung im Nebenhoden von geschlechtsumgekehrten Tfm-Heterozygoten (Mosaiktiere)	24

Inhaltsverzeichnis Fortsetzung:

		Seite
4.	Diskussion	26
	- Zur Bindung von ^{3}H-DHT	26
	- Zur Bindung von ^{3}H-Östradiol	27
	- Verhalten der apikalen und klaren Zellen	28
	- Die basalen Zellen	28
	- Zur Markierung im Bindegewebe	28
	- Die Markierung im Ductus deferens	29
	- Zum Ausfall der Kompetitions-experimente	29
	- Die Bedeutung der Chemographie	30
	- Beobachtungen im Nebenhoden der Mosaiktiere	31
	- Schlußfolgerungen	34
	Tabellen	35
	Abbildungen	37
	Zusammenfassung	52
	Literaturverzeichnis	53

1. Einleitung

1.1 Anatomie des Nebenhodens

Der Nebenhoden wird makroskopisch aufgrund seiner Form und seiner Lage zum Hoden in die Abschnitte Caput, Corpus und Cauda epididymidis unterteilt. Das verdickte Caput liegt bei großen Säugern wie Hund, Rind, Pferd und dem Menschen unmittelbar dem oberen Hodenpol an. Bei kleinen Säugern wie der Maus und der Ratte ist bereits makroskopisch zwischen Hoden und Nebenhoden ein Strang sichtbar, der die Ductuli efferentes enthält. Der Nebenhodenkopf verjüngt sich zum isthmischen Corpus epididymidis, das entlang des Hodens nach caudal zieht und sich am unteren Hodenpol zum Nebenhodenschwanz verdickt. An die Cauda schließt sich der Ductus deferens an.

Die Anatomie des Nebenhodens wurde ausführlich von Benoit (1926) beschrieben. Die makroskopisch sichtbaren Abschnitte müssen sich bei den unterschiedlichen Spezies mikroskopisch nicht immer entsprechen. So nehmen bei größeren Säugern die vom Rete testis heranziehenden Ductuli efferentes den Hauptteil des Caput epididymidis ein. Sie münden getrennt voneinander in den Ductus epididymidis. Bei kleinen Säugern vereinigen sich die Ductuli efferentes zu einem Ductulus efferens. Er schlängelt sich bei der Maus nach Eintritt in den Nebenhodenkopf und bildet ein kleines Läppchen, bevor er in den Nebenhodengang übergeht (Soranzo et al. 1982). Die Unterscheidung zwischen dem Epithel des Ductulus efferens und dem des Nebenhodenganges ist mikroskopisch möglich. Das Epithel des Nebenhodenganges ist höher als das des Ductulus efferens und hat zum Lumen hin nicht die wellenförmige Oberfläche, die für das Epithel des Ductulus efferens charakteristisch ist.

Der an den Ductulus efferens anschließende Teil des Nebenhodens ist als Initialsegment vom übrigen Nebenhodenkopf abgrenzbar. Das Epithel ist höher und der Nebenhodengang weiter als im distalen Teil des Caput epididymidis. Im Initialsegment findet man keine Spermien. Die Unterteilung von Nebenhodenkopf, - körper und - schwanz in weitere Segmente ist strittig. Hamilton (1972) weist in seiner Übersichtsarbeit darauf hin, daß die Einteilung von den jeweils angelegten Kriterien abhängt.

Da in meiner Arbeit zur Beschreibung der Befunde eine Segmenteinteilung benutzt wird, bespreche ich die bisher von anderen Autoren beschriebenen Unterteilungen des Nebenhodens. Reid und Cleland (1957) teilen den Nebenhoden der Ratte in 6 Segmente mit insgesamt 11 Untersegmenten ein. Sie benutzen als Kriterien Epithelhöhe und Ausstattung der Zellen mit Golgiapparat, endoplasmatischem Retikulum und Mitochondrien. Holstein (1969) beschreibt für den Menschen 8 Segmente. Hoffer und Greenberg (1978) finden beim Meerschweinchen 7 Segmente. Nicander (1957) beim Kaninchen 8 Segmente und (1958) beim Rind 6 Segmente.

Bei der Maus legt Pavlok (1974) seiner Untersuchung zur Befruchtungsfähigkeit von Spermien aus dem Nebenhoden eine Einteilung in 7 Segmente zugrunde und bezeichnet sie mit den Buchstaben a - g. Der Nebenhodenkopf umfaßt die Segmente a und b, der Körper c und d und der Schwanz e bis g. Kanka und Kopecny (1977) untersuchen die RNA-Synthese im Nebenhodengang der Maus. Sie benutzen die Einteilung von Pavlok (1974). Sie trennen jedoch vom Segment a das Initialsegment (I) ab, da es eine besonders hohe RNA-Synthese aufweist. Soranzo et al. (1982) beschreiben die Ultrastruktur des Nebenhodens der Maus. Sie weisen auf die Gliederung des Caput epididymidis in 6 Läppchen hin, an die sich Corpus und Cauda anschließen. Die Läppchengrenzen sind in der mikroskopischen Übersicht deutlich zu erkennen, da durch Aneinanderlagern der Läppchen ein breiter Bindegewebsspalt zwischen den Konvoluten des Nebenhodenganges zweier Läppchen sichtbar wird. Die Autoren fassen

mehrere Läppchen, die sich histologisch entsprechen, zu einem Segment zusammen. Das Initialsegment umfaßt die ersten beiden Läppchen, das Kopfsegment umfaßt die Läppchen 3 und 4 und das Intermediärsegment die Läppchen 5 und 6. Histologisch beginnt das Corpus mit dem siebten Läppchen.

Zur Beschreibung der Hormonbindung in den Hauptzellen unterteile ich den Nebenhoden der Maus in meiner Arbeit in 10 Segmente. Meiner Einteilung liegen Längsschnitte zugrunde, die mit dem Kryostat gewonnen wurden.

Die Gliederung erfolgt nach den sichtbaren Läppchengrenzen, nach der Epithelhöhe, den im Epithel vorhandenen Zellarten, der Dicke der Muskulatur und der Weite des Nebenhodenganges. Meine Einteilung entspricht weitgehend der von Kanka und Kopecny (1977). Den distalen Nebenhodenkopf unterteile ich in 3 Segmente. Den ersten Anteil des gestreckten Ductus deferens bezeichne ich als Segment 10.

Das Epithel des Nebenhodenganges setzt sich bei allen Säugern aus Hauptzellen und Basalzellen zusammen (Hamilton 1972). Daneben kommen eine Reihe spezialisierter Zellen vor. Bei der Maus sind im Nebenhodenkopf zwischen den Hauptzellen apikale Zellen und im Nebenhodenkörper und Schwanz klare Zellen vorhanden. Im folgenden gebe ich eine kurze Charakterisierung der einzelnen Zelltypen im Nebenhodenepithel der Maus, wie sie aus den Beschreibungen von Benoit (1926), Hamilton (1972) und Soranzo et al. (1982) hervorgehen.

- Hauptzellen: Die regulären Epithelzellen des Nebenhodenganges werden als Hauptzellen bezeichnet. Ihr Zellkern liegt basal. Im Initialsegment sind sie hochprismatisch. Die Zellhöhe nimmt nach distal ab. In der Cauda epididymidis ist die Zelle isoprismatisch.

- Basalzellen: Sie sind im gesamten Nebenhoden anzutreffen. Im histologischen Schnitt zeigen sie eine dreizipflige Zellform und einen flachen Zellkern. Sie sitzen der Basalmembran auf und haben keine Verbindung zum Lumen.

- Apikale Zellen: Sie sind nur im Caput epididymidis zu finden. Von den Hauptzellen unterscheiden sie sich durch einen zum Lumen hin gelegenen Kern und einen sich zur Basalmembran hin verjüngenden Zelleib.

- Klare Zellen: Sie kommen nur im Corpus und der Cauda epididymidis vor. Ihr Zytoplasma enthält eingeschlossene lipophile Substanzen, die in Paraffinschnitten nicht dargestellt werden. Deshalb erscheint ihr Zytoplasma wabig durchsichtig. Ihre Häufigkeit nimmt in der Cauda epididymidis zu.

- Halozellen: Sie wurden von Hamilton (1972) als durch das Epithel durchwandernde Lymphozyten identifiziert. Im folgenden werden sie nicht betrachtet.

Unter der Basalmembran des Epithels liegt eine Schicht von Fibromyocyten. In der Cauda epididymidis nimmt ihre Schichtdicke zu und geht dann in die Muskelschicht des Ductus deferens über. Im Ductus deferns liegt zwischen Muskelschicht und Epithel noch eine Bindegewebslage. Im lockeren Bindegewebe, finden sich Fibroblasten, Makrophagen, eosinophile Granulozyten und Gefäßzellen (Hamilton 1972).

1.2 Funktion des Nebenhodens

Der Nebenhoden transportiert und speichert Spermien. Beim Durchqueren reifen die Spermien, d. h. ihre Fähigkeit zur Befruchtung nimmt bei der Passage der einzelnen Abschnitte zu (Pavlok 1974).

Im Rahmen dieser Aufgaben werden vom Epithel Substanzen resorbiert und sezerniert. In den einzelnen Zellarten und Abschnitten finden diese Prozesse in qualitativ und quantitativ unterschiedlichem Ausmaß statt (Hamilton 1972, Flickinger 1981, Moore und Bedford 1979 a). Bei der Maus erfolgt die Resorption der testikulär sezernierten Flüssigkeit hauptsächlich im Nebenhodenkopf (Young 1933), die Speicherung vornehmlich in der Cauda epididymidis.

1.3 Androgenabhängigkeit des Nebenhodens

Der Nebenhoden ist androgenabhängig. Nach Kastration nimmt das Zellvolumen der Hauptzellen - besonders sichtbar an der Epithelhöhe - ab, intrazelluläre Bestandteile wie der Golgiapparat oder das endoplasmatische Retikulum sind in den Hauptzellen reduziert (Benoit 1926, Moore und Bedfort 1979 a, Hamilton et al. 1969). Testosterongabe kann diese Veränderungen zum Teil oder ganz wieder aufheben (Hamilton 1972). Die Erhaltung des Wolffschen Ganges, aus dem sich der Nebenhoden differenziert, ist ebenfalls androgenabhängig. Bei männlichen Tieren mit einem Defekt der Testosteronsynthese oder einem Androgenrezeptordefekt ist im erwachsenen Tier kein Nebenhoden vorhanden.

Als molekulares Substrat der Androgenabhängigkeit beschreiben Tindall et al. (1974) Pujol und Bayard (1979) im Nebenhoden ein zytoplasmatisches Rezeptorprotein. Es ist identisch mit dem Androgenrezeptor der ventralen Prostata (Wilson und French 1976) an dem bei der Ratte Dihydrotestosteron (DHT) und Testosteron am spezifischsten von allen Steroidhormonen und ihren Derivaten binden (Liao et al. 1973). Testosteron wird nach Aufnahme in den Nebenhoden sofort in DHT umgewandelt (Tindall et al. 1972).

1.4 Modell zum Wirkungmechanismus von Steroidhormonen

Steroidhormone verbinden sich nach Eintritt in die Zelle mit ihren spezifischen zytoplasmatischen Rezeptorproteinen. Der Steroidrezeptorkomplex tritt nach einer Konformationsänderung in den Zellkern über und reagiert dort mit Akzeptorstellen. Nach einigen im Detail noch unbekannten Folgeschritten kommt es zur Steigerung der RNA-Synthese (Liao 1976, Jensen und De Sombre 1973).

1.5 Östradiol in männlichen Sexualorganen

In männlichen Sexualorganen sind spezifische Östrogen-Bindungsstellen vorhanden. Flüchter et al. (1982) weisen im menschlichen Prostatagewebe Östrogenrezeptoren nach. Stumpf und Sar (1976) finden autoradiographisch im Samenblasenepithel der Ratte und in der Prostata des Hamsters gebundenes ^{3}H-Östradiol in den Zellkernen. Im Nebenhoden der Ratte beobachten sie im Epithel nur eine schwache Östradiolbindung. Leav et al. (1979) beschreiben in der Prostata des Hundes eine biologische Wirkung von Östrogenen. Mit Östradiol lassen sich atrophische Drüsenzellen von kastrierten oder hypophysektomierten Tieren stimulieren. Die Sekretionsgranula nach Östradiolstimulation sind jedoch kleiner und weniger elektronendicht als bei nicht kastrierten Tieren (Merk et al. 1980).

1.6 Die Tfm-Mutation der Maus

Die von Lyon und Hawkes (1970) beschriebene Tfm-Mutation der Maus (Tfm = testikuläre Feminisierung) entspricht dem Syndrom der testikulären Feminisierung beim Menschen. Bei genotypisch männlichen Tieren sind außer kleinen intraabdominellen Hoden keine inneren Genitalorgane vorhanden. Das äußere Genitale ist weiblich, mit kurzer blind endender Vagina. Die Mutation wird X-chromosomal vererbt. Gehring und Tomkins (1974) und Attardi und Ohno (1974) finden bei diesen Tieren eine auf ungefähr 10 bis 25% des Normalwertes verringerte spezifische Androgen-Bindung in der Niere. Sie

folgern daraus, daß es sich bei der Mutation um einen Androgenrezeptordefekt handelt. Der Androgenrezeptordefekt verhindert die Aufrechterhaltung und Differenzierung der Wolffschen Gänge. Daher sind im adulten Tier keine Derivate der Gänge vorhanden. Da die embryonalen Hoden neben Androgenen auch noch das Anti-Muellerian-Hormon (AMH) produzieren, das die Degeneration der Muellerschen Gänge bewirkt, finden sich im adulten Tier auch keine Derivate der Muellerschen Gänge wie Tuben oder Uterus.

1.7 Der Sxr-Faktor der Maus

Der Sxr-Faktor (sex reversed) führt zum Auftreten von X/X-Männchen (Cattanach et al. 1971). Der Faktor zeigt einen dominanten Erbgang. Es findet sich ein vollständig ausgebildetes, männliches Genitale. Da Spermatogonien mit zwei X-Chromosomen zugrunde gehen, bleiben die Hoden klein.

1.8 Geschlechtsumgekehrte, für die Tfm-Mutation heterozygote Mäuse (Mosaiktiere)

Wenn in einer somatischen Zelle zwei X-Chromosomen vorhanden sind, wird eines der beiden inaktiviert (Lyon 1961). Die X-Inaktivierung findet in der frühen Embryonalentwicklung statt. Geschlechtsumgekehrte Mäuse besitzen einen weiblichen Geschlechtschromosomensatz (XX-Sxr-Männchen). Die X-Inaktivierung erfolgt wie beim weiblichen Tier. In einem Tier, bei dem eines der beiden X-Chromosomen die Tfm-Mutation trägt, findet sich ein Mosaik aus androgenempfindlichen und androgenunempfindlichen Zellen. In den androgenunempfindlichen Zellen ist das X^{Tfm}-Chromosom aktiv. In geschlechtsumgekehrten für die Tfm-Mutation heterozygoten Mäusen (Genotyp: X^{+}/X^{Tfm}-Sxr) kommt dieses Mosaik zum Ausdruck, da diese Tiere Hoden besitzen und sich während der Embryonalzeit in die männliche Richtung entwickeln. Durch Androgenstimulation auf das Mosaik aus androgenunempfindlichen und androgenempfindlichen

Zellen kommt es zur Ausbildung eines intersexuellen Phänotyps. Bei den Genitalorganen ergibt sich folgender Befund: Die Prostataläppchen und die Samenbläschen sind kleiner als beim männlichen Tier und asymetrisch ausgebildet. Es findet sich manchmal eine blind endende Vagina und häufig eine Hypospadie (Drews 1975). Der Musculus levator ani ist weniger entwickelt als beim männlichen Tier.

Im Nebenhoden ist das Mosaik aus X^{Tfm}-Zellen und X^{+}-Zellen im adulten Tier sichtbar (Drews und Alonso Lozano 1974). Es zeigen sich wegen des unterschiedlichen Verhältnisses von X^{+}-Zellen zu X^{Tfm}-Zellen in den einzelnen Tieren große interindividuelle Unterschiede in der Größe des Nebenhodens und der Ausbildung der einzelnen Abschnitte (Drews 1975). Im Nebenhodenepithel dieser Tiere sind neben Bezirken mit Haupt-, Basal-, apikalen und klaren Zellen noch Bezirke von flachen, wenig differenzierten Zellen zu finden. Sie werden als Abkömmlinge der androgeninsensitiven X^{Tfm}-Zellen des Wolffschen Ganges angesehen. Die Tiere zeigen im Laufe ihres Lebens oft eine steril-entzündliche Abstoßungsreaktion des Gewebes, die im Nebenhodenschwanz beginnt (Drews und Dieterich 1978). Sie kann sich im gesamten Nebenhoden ausbreiten und die histologische Struktur zerstören.

1.9 Autoradiographische Darstellung von Steroidbindung in Gewebeschnitten

Autoradiographisch können Steroide, die mit radioaktivem Tritium markiert sind, auf zellulärer Ebene in Gewebeschnitten dargestellt werden, wenn sie sich aufgrund einer spezifischen Bindung im Gegensatz zu ihrer Umgebung anreichern. Die beim Tritiumzerfall entstehende β-Strahlung reduziert die Silberionen der ober- oder unterhalb des Gewebeschnittes gelegenen Photoemulsion. Nach photographischer Entwicklung wird über spezifisch bindenden Strukturen dann eine Silberkörneranhäufung festgestellt. Voraussetzung ist allerdings, daß das radioaktiv markierte Steroid

bzw. der Steroidrezeptorkomplex bis zum Ende der photographischen Exposition nicht von seinen Bindungsstellen abdiffundiert. Steroide sind lipidlöslich, in pharmakologischer und physiologischer Konzentration sind sie auch wasserlöslich. Der Steroidrezeptor und der Steroidrezeptorkomplex sind ebenfalls wasserlöslich. Daher ist jedes Verfahren, bei dem der Gewebeschnitt bis zur Beendigung der Expositionszeit einem solchen Lösungsmittel ausgesetzt wird, nicht anwendbar.

Bei der Paraffinschnittechnik kommt der Schnitt während der Paraffinierung und Entparaffinierung mit lipophilen und hydrophilen Lösungsmitteln in Berührung. Bei der üblicherweise angewandten Kryostatschnittechnik wird der Schnitt aufgetaut und dann fixiert. Dabei kommt es zur Diffusion des wasserlöslichen Steroidrezeptorkomplexes.

Bei der von Stumpf (Stumpf und Sar 1975) entwickelten Methode, die im Methodenteil näher dargestellt ist, wird der tiefgefrorene Gewebeschnitt auf einen mit Photoemulsion beschichteten Objektträger aufgebracht und sofort wieder tiefgefroren, getrocknet und zur Exposition gelagert. Zu einer nennenswerten Diffusion des radioaktiv markierten Steroids kommt es dabei nicht. Die kritische Prüfung der Methode ergibt, daß sich nur über den Zellkernen von Zielzellen des entsprechenden Steroids eine Anreicherung von Silberkörnern findet. Die Lokalisation von Silberkörnern über dem Zytoplasma der Zellen läßt sich zur Auswertung nicht heranziehen, da sie in Nicht-Zielzellen in gleicher Weise auftritt. Nach der Definition von Sheridan et al. (1981) können daher nur die Zellen als markiert bezeichnet werden, bei denen eine Anreicherung der Silberkörner über den Zellkernen nachweisbar ist. Die Anreicherung erreicht eine Stunde nach der Injektion ihr Maximum (Sar et al. 1970).

1.10 Ziel der Arbeit

Es war das Ziel der Arbeit, das im Nebenhoden der geschlechtsumgekehrten, für Tfm-heterozygoten Mäuse vorhandene Mosaik aus androgensensitiven und androgeninsensitiven Zellen durch die Lokalisation der DHT-Bindung darzustellen. Im Verlauf der Arbeit zeigte sich, daß bereits im normalen Nebenhoden der Maus ein differenziertes Muster der DHT-Bindung vorliegt, das ich aufgrund der bisherigen autoradiographischen und biochemischen Untersuchungen am Nebenhoden nicht erwartet hatte. Zusätzlich fand ich spezifische Bindungsstellen für ^{3}H-Östradiol.

In meiner Arbeit beschreibe ich daher zunächst die Lokalisation von ^{3}H-DHT und ^{3}H-Östradiol im normalen Nebenhoden der Maus. Anschließend stelle ich meine im Nebenhoden der Mosaiktiere gemachten Beobachtungen dar.

2. Material und Methode

2.1 Tiere

Die für die Experimente verwendeten Mäuse stammen aus der im Anatomischen Institut in Tübingen gehaltenen Kolonie, in der die Tfm-Mutation, der Sxr-Faktor, sowie die X-gebundenen Fellfarbenmarker Tabby und Blotchy weitergeführt werden. Sie waren zwischen 50 und 130 Tage alt. Die Experimente selbst habe ich während eines Forschungsaufenthaltes im Labor von Herrn Prof. W. Stumpf, Chapel Hill, North Carolina, USA, durchgeführt. Die Auswertung der Schnittserien erfolgte wieder in Tübingen.

Für die Untersuchung am normalen Nebenhoden wurden X/Y Männchen und X/X-Sxr-Männchen verwendet. Die Mosaiktiere stammten aus der Paarung von weiblichen Überträgern der Tfm-Mutation (X^{+}/X^{Tfm}) mit männlichen Überträgern des Sxr-Faktors (X^{+}/Y-Sxr). Zur Unterscheidung der geschlechtsumgekehrten Tiere von normalen Männchen und zur Identifizierung der Tfm-Heterozygoten (X^{+}/X^{Tfm}) wurden die Fellfarbenmarker Blotchy und Tabby eingesetzt:

a) Blotchy: Im hemi - bzw. homozygoten Zustand drückt sich die Mutation in einer silbergrauen Fellfarbe aus. Im heterozygoten Zustand sind graue Flecken im Fell sichtbar.

b) Tabby: Hemi - bzw. homozygoten Trägern fehlt das Unterfell, daher ist die Fellfarbe rotbraun. Die Tiere sind an Schwanz und Ohren nackt. Ebenso besitzen die Tiere keine Präputialdrüsen. Im heterozygoten Zustand zeigen die Tiere eine schwarze Tigerstreifung am Rücken.

Zur Identifizierung der Mosaiktiere wurden folgende Kriterien verwandt:

a) Der anogenitale Abstand, der bei Mosaiktieren zwischen dem männlicher und weiblicher Tiere liegt.

b) Die bei Mosaiktieren meist vorliegende Hypospadie.

c) Die Morphologie der inneren Genitalorgane, die bei der Präparation beurteilt wurde.

2.2 Kastration

Alle Tiere, denen ^{3}H-DHT injiziert werden sollte, wurden 36 Stunden vor dem Experiment kastriert, um den endogenen Androgenspiegel zu senken und die Konzentration an freiem, zytoplasmatischem Androgenrezeptor zu heben (Blondeau et al. 1975). Weil bei X^+/X^{Tfm}-Sxr Mäusen die Hoden im Bauchraum liegen, wählte ich einen intraabdominellen Zugang mit Schnitt über der Leiste. Der Hoden wurde vorsichtig freipräpariert und die Arteria testicularis und der Ductus efferens am Hoden unterbunden. Die Operation fand unter Rompun (Bayer) und Ketanest (Parke - Davis) Anästhesie statt.

2.3 Injektion

Allen Tieren wurde 1 Stunde vor dem Tod unter Äthernarkose radioaktives Steroid in die freigelegte Vena jugularis injiziert. Zwei Tiere mit dem Genotyp X^+/X^+-Sxr und vier mit dem Genotyp X^+/X^{Tfm}-Sxr erhielten 0,5 µg pro 100 g Körpergewicht (1, 2, 4, 5, 6, 7, 16, 17) ^{3}H-DHT (spezifische Aktivität 179 Ci/mmol, New England Nuclear). Zwei X^+/X^+-Sxr Mäuse und drei X^+/X^{Tfm}-Sxr Tiere erhielten 0,5 µg je 100 g Körpergewicht (2, 4, 6, 7, 16, 17) ^{3}H-Östradiol (spezifische Aktivität 137 Ci/mmol, New England Nuclear). 0,76 µg ^{3}H-DHT oder 0,5 µg ^{3}H-Östradiol waren in 1 ml isotonischer 10% Äthanol-Kochsalzlösung gelöst.

Um eine unspezifische Bindung von Östradiol an den Androgenrezeptor und von DHT an den Östrogenrezeptor festzustellen, wurde je zwei (X^+/Y) Mäusen 0,5µg ^{3}H-DHT und 5 µg nicht radioaktives DHT (Sigma) pro 100 g Körpergewicht bzw. 0,5 µg ^{3}H-DHT und 5 µg nicht radioaktives Östradiol pro 100 g Körpergewicht injiziert.

Ebenso erhielten je zwei Mäuse 0,5 µg ^{3}H-Östradiol und 5 µg normales Östradiol bzw. 0,5 µg ^{3}H-Östradiol und 5 µg normales DHT pro 100 g Körpergewicht. 20 µg des nicht radioaktiv markierten Hormons war in 1 ml isotoner 20% Äthanol-Kochsalzlösung gelöst.

In Tfm-Zellen des Epithels war eine ^{3}H-Östradiolbindung möglich. Daher verwendete ich bei den Kompetitionsexperimenten mit ^{3}H-Östradiol Mosaiktiere.

Alle Tiere dieses Experiments sind in Tabelle 1 mit Genotyp, Alter und injizierter Substanz dargestellt.

2.4 Präparation und Einfrieren des Gewebes

Die Tiere wurden nach einer Stunde unter leichter Äthernarkose enthauptet, ausgeblutet, die Nebenhoden zügig entnommen und auf eisgekühlten Platten vom anhängenden Fettgewebe befreit. Nach ungefähr 5 Minuten wurde der gesamte Nebenhoden auf einen mit Leber beschichteten Gewebehalter gelegt. Es wurde darauf geachtet, daß später Längsschnitte durch den gesamten Nebenhoden möglich waren.

Der Gewebehalter wurde mit einer Pinzette gefaßt und zur Vermeidung von Gewebsbrüchen langsam in flüssiges Propan getaucht. Das gefrorene Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff bis zum Schneiden gelagert.

2.5 Befilmen der Objektträger

Fettfreie, geputzte Objektträger wurden auf ungefähr 45°C staubfrei im Trockenschrank erwärmt und kurz in 40°C warme Fotoemulsion (Kodak NTB 3)eingetaucht. Es wurde bei Rotlicht gearbeitet (Kodak safe light Nummer 2).

Die befilmten Objektträger trockneten in völliger Dunkelheit über Nacht bei Raumtemperatur und wurden dann in mit Trockenmittel gefüllten, lichtgeschützten Boxen bis zum Gebrauch bei - 5°C gelagert. Um die Qualität der Emulsion vor dem Befilmen zu bestimmen, wurde ein Objektträger befilmt, 10 Minuten getrocknet und nach der unten beschriebenen Methode entwickelt. Unterschritt die Anzahl der Silberkörner die Zahl 25 pro 5600 µm², so war die Emulsion brauchbar. Ebenso wurde mit einem Objektträger verfahren, der über Nacht getrocknet war, um eine eventuell durch eingedrungenes Licht zerstörte Fotoemulsionsschicht zu entdecken.

2.6 Schneiden

Im Kryostat (Wide-Range-Cryostat, Harris Mfg & Co, N-Billerica Ma, USA) wurden bei - 30° bis - 35° C , 4 bis 5 µm dicke Schnitte vom Nebenhoden angefertigt.

Unter Rotlicht (Kodak Nr. 2) wurden die Schnitte durch kurzes Berühren mit einem auf Raumtemperatur erwärmten, befilmten Objektträger vom Messer auf die Fotoemulsion aufgebracht. Die Schnitte tauten dabei kurz auf und hefteten sich auf die Emulsion. Die dabei auftretende Diffusion des Steroidrezeptorkomplexes ist zu vernachlässigen (Stumpf und Sar 1975).

Allerdings reduzierten sich Silberionen bei diesem Vorgang zu Silber (Chemographie), was die Auswertung einschränkt. Diese Reaktion ist je nach Gewebeart unterschiedlich. Während sie im

Epithel kaum auftritt, schränkt sie die Auswertung im Bindegewebe erheblich ein. Sie tritt intrazellulär gleichmäßig auf und wird durch Entwicklung eines Objektträgers unmittelbar nach dem Aufbringen des Schnittes dokumentiert. Ebenfalls können Silberionen durch Druck des Objektträgers auf das Messer reduziert werden. Dies behindert den qualitativen Vergleich zwischen zwei Objektträgern mit Nebenhodenschnitten desselben Tieres. Es war deshalb erstrebenswert, Längsschnitte zu erhalten, in denen alle Abschnitte des Nebenhodens zu beurteilen waren.

Nach dem Schneiden und Aufbringen der Schnitte auf die Objektträger wurden die Objektträger in lichtgeschützten, mit Trockenmittel ($Ca\ Cl_2$) gefüllten Boxen bei - 10°C zur photographischen Exposition gelagert.

2.7 Entwicklung und Färbung

Nach der Expositionszeit, die durch Probeentwicklung festzustellen ist und bei mir im Mittel 5 Monate betrug, wurden die Boxen langsam über 6 Stunden auf Raumtemperatur aufgetaut.

Die Objektträger wurden zur histologischen Fixierung der Schnitte 45 Sekunden lang in 4%ige phosphatgepufferte Formaldehyd-Lösung (pH 7,0, 16°C) gestellt. Die Fixierung stoppt eine mögliche Autolyse der Schnitte durch Enzyme bei Raumtemperatur. Die Anfärbbarkeit des Gewebes wird ebenfalls verbessert.

Danach wässerte man für 1 Minute in aqua dest.. Die Fotoemulsion wurde 45 bis 60 Sekunden in Kodak D 19 Entwickler (1:1 in aqua dest. gelöst) entwickelt. Nach 1-minütiger Wässerung erfolgte eine 5-minütige photographische Fixierung in Kodak rapid fixer. Die Fixierlösung wurde 10 Minuten lang mit Leitungswasser ausgewaschen. Anschließend färbte ich die Schnitte 1 Minute lang mit Methylgrünpyronin oder Methylenblau- basisches Fuchsin. Bei diesen Färbungen wird die Silberkörnerzahl zumindest nicht merklich vermindert. Die Schnitte wurden nochmals gewässert, getrocknet und mit Paramount eingedeckelt.

3. Ergebnisse

3.1 Segmenteinteilung des Nebenhodens und Auswertung

3.1.1 Segmenteinteilung

Zur Beschreibung der Befunde in den Hauptzellen entlang des Nebenhodenganges unterteile ich den Nebenhoden nach Kanka und Kopecny (1977) in 9 Segmente. Das Segment 9 entspricht dem intraepididymalen Konvolut des Ductus deferens. Ein weiteres Segment (Nr. 10) umfaßt den ersten Teil des gestreckten Ductus deferens. Das Segment 1 ist mit dem Initialsegment von Benoit (1926) identisch. Als Segmentgrenzen dienen wie bei Soranzo et al. (1982) im Caput und Corpus epididymidis die Läppchengrenzen. Für die Segmentgrenzen in der Cauda epididymidis lege ich eine Abbildung von Pavlok (1974) zugrunde.

Die Einteilung in Segmente erfolgt nach der Höhe des Epithels, der Lumenweite des Ganges, dem Vorkommen von apikalen und klaren Zellen und der Dicke, der den Gang umgebenden Muskulatur. Der Anfang des Ductus deferens ist durch das Auftreten einer Bindegewebsschicht zwischen Epithel und Muskulatur gekennzeichnet.

Die Kriterien werden bei der Beschreibung der Befunde im Einzelnen aufgeführt. Da die Übergänge zwischen den Segmenten fließend sind, und die Längsschnitte einander nicht genau entsprechen, ist es möglich, daß die Ausdehnung der Segmente von Tier zu Tier etwas variiert. Die Segmentgrenzen sind in der Abb. 1 und 2 eingetragen. Die Abbildungen entstanden nach einer Zeichnung eines repräsentativen Kryostatschnittes. Die Zeichnung wurde mit einem Zeichenspiegel am Mikroskop angefertigt.

3.1.2. Beurteilungskriterien bei der Auswertung der Autoradiographien

Die spezifische Bindung von ^{3}H-DHT oder ^{3}H-Östradiol zeigt sich nach Sheridan et al. (1981) als Markierung der Zellkerne mit Silberkörnern. Die Markierung eines Zellkerns nehme ich als sicher an, wenn sich die Anreicherung von Silberkörnern über dem Zellkern deutlich von der Silberkorndichte des Zytoplasmas abhebt. Diese Zellen nenne ich im folgenden markiert oder beladen. Die Anzahl von Silberkörnern über 50 Hauptzellen aus jedem Segment habe ich ausgezählt, wenn ein Längsschnitt über den gesamten Nebenhoden männlicher Tiere vorliegt. Dies ist bei 5 Tieren der Fall (E 2, DHT 1, 2, 5, 6) (Tabelle 2). Da im Zytoplasma kein nennenswerter Unterschied im unspezifischen Hintergrund entlang des Ganges vorhanden ist, habe ich auf eine Korrektur der erhaltenen Werte verzichtet.

3.2 ^{3}H-DHT und ^{3}H-Östradiolbindung im Epithel des Nebenhodens

3.2.1 Ductulus efferens

Wie eingangs erwähnt, beschreibt Benoit (1926) bei der Maus vom Rete testis heranziehende Ductuli efferentes, die sich zu einem Ductulus efferens vereinigen. Ich beziehe in meiner Arbeit den Ductulus efferens in die Beschreibung ein.

Ein Teil des Ductulus efferens findet sich auf meinen Kryostatschnitten als abgesondertes Konvolut außerhalb des Nebenhodens. Ein weiterer Abschnitt ist in den Kopf des Nebenhodens inkorporiert. Das Epithel besteht aus isoprismatischen bis hochprismatischen Zellen und zeigt zum Lumen hin eine charakteristische, wellenförmige Oberfläche. Auf meinen Kryostatschnitten kann ich den Zilienbesatz, den ein Teil der Zellen trägt, schlecht erkennen. Der Übergang in das Segment 1 des Nebenhodenkopfes ist aufgrund der unterschiedlichen Epithelbeschaffenheit deutlich sichtbar.

^{3}H-DHT: Abbildung 3 zeigt, daß mit ^{3}H-DHT eine deutliche Markierung in den Zellkernen der Epithelzellen des Ductulus efferens vorhanden ist. Die Basalzellen sind nicht markiert.

^{3}H-Östradiol: Das Epithel des Ductulus efferens zeigt die stärkste Östradiolmarkierung in den ableitenden Samenwegen (Abb. 4, Tabl. 2) Sie ist noch höher als in den Hauptzellen des Initialsegmentes. Basalzellen sind nicht beladen.

Die unterschiedliche Markierung über den Zellkernen nach Gabe von ^{3}H-DHT (Abb. 3) und ^{3}H-Östradiol (Abb. 4) sagt nichts aus über das quantitative Verhältnis der ^{3}H-DHT-Bindung zur ^{3}H-Östradiol-Bindung. Meine quantitativen Aussagen beziehen sich immer auf Markierungsunterschiede im gleichen Schnitt.

3.2.2 Segment 1 (Initialsegment)

Im Epithel des Initialsegmentes sind neben Haupt- und Basalzellen noch apikale Zellen vorhanden. Apikale Zellen sind charakterisiert durch einen keilförmigen Zelleib und einen dem Lumen zu gelegenen Kern. Der Zelleib wölbt sich häufig in das Lumen vor. Die Vorwölbung der apikalen Zellen tritt nach Kastration wahrscheinlich wegen der reduzierten Zellhöhe der Hauptzellen besonders deutlich in Erscheinung. Das Lumen ist weiter als im übrigen Caput epididymidis.

^{3}H-DHT: Die Beladung der Hauptzellkerne ist die stärkste im gesamten Nebenhoden. (Tabelle 2). Die apikalen Zellen zeigen gegenüber den Hauptzellen eine verminderte Markierung (Abb. 5). Basalzellen sind, wie im übrigen Nebenhoden, nicht markiert.

^{3}H-Östradiol: Aus der Tabelle 2 geht hervor, daß die Bindung von ^{3}H-Östradiol in den Hauptzellen des Initialsegmentes höher ist als im übrigen Nebenhoden. Am Übergang vom Initialsegment zum Segment 2 läßt sich wie beim DHT ein deutlicher Intensitätssprung erkennen, der an den folgenden Segmentgrenzen nicht zu sehen ist (Abb. 8). Die Kerne der apikalen Zellen sind ebenso stark wie die der Hauptzellen beladen (Abb. 6). Dagegen binden die Basalzellen im Initialsegment wie auch im übrigen Nebenhoden kein Östradiol.

3.2.3 Segmente 2 bis 4 (Distaler Teil des Nebenhodenkopfes)

In den Segmenten 2 bis 4 sind im Epithel die gleichen Zellarten wie im Segment 1 vorhanden. Die Epithelhöhe und die Lumenweite haben abgenommen (Benoit 1926).

^{3}H-DHT: Die Kerne der Hauptzellen sind in geringerem Maße als die in Segment 1 beladen. Dies ist an der Segmentgrenze von Segment 1 nach Segment 2 deutlich zu beobachten (Abb. 7). Die Markierung der Hauptzellen verringert sich nach distal und ist am Übergang zum Corpus epididymidis (Segment 5) nicht mehr festzustellen. Die Kerne der apikalen Zellen zeigen wie im Segment 1 eine geringere Beladung als die Kerne der Hauptzellen. Die Markierung verringert sich ebenfalls nach distal und ist bereits in den Segmenten 3 und 4 nicht mehr zu beobachten (Abb. 9).

^{3}H-Östradiol: Ebenso wie die ^{3}H-DHT-Bindung nimmt die Östradiolbindung in den Hauptzellen nach distal ab und ist schon vor dem Übergang in das Corpus epididymidis nicht mehr erkennbar. Apikale Zellen zeigen eine stärkere Markierung als die Hauptzellen. In Segment 4 sind die apikalen Zellen praktisch die einzigen markierten Zellen des Epithels (Abb. 10).

3.2.4 Segmente 5 und 6 (Corpus epididymidis)

Im Corpus nimmt die Epithelhöhe weiter ab. Der Nebenhodengang wird wieder weiter. Apikale Zellen sind nicht mehr im Epithel zu finden, dagegen sieht man in Segment 5 vereinzelt klare Zellen. Ihre Anzahl nimmt nach caudal zu. Die klaren Zellen besitzen viele lipidhaltige Vakuolen. Daher sind sie bei der Methylgrünpyronin- und der Methylenblau-basisches Fuchsin-Färbung im Gefrierschnitt aufgrund ihres wabigen, wasserklaren Zytoplasmas zu erkennen.

^{3}H-DHT: In den Hauptzellen ist keine Markierung zu erkennen (Abb. 11). Auch die klaren Zellen sind nicht beladen.

^{3}H-Östradiol: In den Hauptzellen ist keine Östradiolbindung festzustellen. Dagegen beobachtet man in den Kernen der klaren Zellen bereits in Segment 5 eine nach distal zunehmende Beladung (Abb. 12).

3.2.5 Segmente 7 bis 9 (Cauda epididymidis und Übergang in den Ductus deferens

Im Nebenhodenschwanz sind die gleichen Zellarten wie im Corpus epididymidis vorhanden. Klare Zellen sind häufiger zu finden. Die Epithelhöhe nimmt weiter ab und erreicht in Segment 8 ein Minimum. Beim Übergang zum Ductus deferens in Segment 9 nimmt die Zellhöhe allmählich wieder zu. Das Lumen erreicht in Segment 8 die größte Weite und nimmt zum Ductus deferens hin ab. Die Dicke der Muskelschicht vergrößert sich ständig. In Segment 9 schiebt sich zwischen Epithel und Muskulatur eine dünne Bindegewebsschicht ein. Das Segment 9 kann man daher als Beginn des Ductus deferens bezeichnen.

^{3}H-DHT: Von Segment 7 an nimmt die Beladung der Hauptzellkerne kontinuierlich zu und erreicht in Segment 8 ein zweites Maximum (Abb. 13). Danach fällt die Markierung wieder ab. Klare Zellen sind markiert. Die Markierung ist schwächer als die der Hauptzellen.

^{3}H-Östradiol: Im Gegensatz zur Markierung mit ^{3}H-DHT ist in den Hauptzellen des Nebenhodenkörpers mit ^{3}H-Östradiol keine Markierung über den Zellkernen zu beobachten. Lediglich die klaren Zellen sind markiert (Abb. 14). Ihre Kernbeladung erreicht die gleiche Intensität wie in den apikalen Zellen des Nebenhodenkopfes.

3.2.6 Ductus deferens

Ich unterscheide beim Ductus deferens einen ersten, zum Teil noch intraepididymal gelegenen, gestreckten Abschnitt und einen außerhalb des Epididymis gelegenen Abschnitt. Der erste Teil des Ductus deferens enthält noch klare Zellen, wie sie für den Nebenhodenschwanz charakteristisch sind. Er ist in der Abbildung 1 und 2 als 10. Segment des Nebenhodens ausgewiesen. Im Segment 10 nimmt die Epithelhöhe im Ductus deferens allmählich zu und auch die Wandschichten erreichen im Verlauf dieses Segments ihre endgültige Dicke.

^{3}H-DHT: Im Verlauf des Segments 10 nimmt die Beladung der Hauptzellkerne ab. Die klaren Zellen in Segment 10 sind mit ^{3}H-DHT nicht markiert. Außerhalb des Nebenhodens zeigen die Epithelzellen im Ductus deferens keine Markierung (Abb. 15).

^{3}H-Östradiol: Die Epithelzellen des Ductus deferens zeigen keine Östradiolbindung (Abb. 16). Lediglich in den klaren Zellen, die in Segment 10 noch vereinzelt vorkommen, beobachte ich eine geringe Markierung.

3.3 ^{3}H-DHT-Bindung und ^{3}H-Östradiol-Bindung im Bindegewebe des Nebenhodens

Durch Chemographie beim Aufbringen des Gefrierschnittes auf den Objektträger entsteht im Bindegewebe - im Gegensatz zum Epithel - eine artifizielle Silberkorndichte. Sie erschwert das Erkennen von markierten Zellen. Daher ist die Auswertung im Bindegewebe eingeschränkt. Durch die hohe Silberkorndichte ist die Zellmorphologie schlechter zu erkennen. Eine eindeutige Zuordnung einer Zelle zu einer bestimmten Zellart ist daher oft nicht möglich. Auf eine Aussage über die ^{3}H-DHT und über die ^{3}H-Östradiol-Bindung in den einzelnen Zellarten des Bindegewebes wird daher verzichtet. In der Muskelschicht um den Ductus deferens ist die Chemographie weniger stark als im Bindegewebe ausgeprägt.

^{3}H-DHT: Einige Zellen im Bindegewebe und einige Zellen der subepithelial gelegenen Fibromyozytenschicht sind so stark markiert, daß sie sich von der hohen Silberkorndichte abheben (Abb. 21).

In der Muskelschicht um den Ductus deferens beobachtet man Areale mit gut markierten Myozytenkernen neben Arealen, in denen die Myozytenkerne nicht markiert sind. Einige Zellen der Bindegewebsschicht, die zwischen Epithel und Muskelschicht des Ductus deferens liegt, sind markiert (Abb. 15).

^{3}H-Östradiol: Auch nach Gabe von ^{3}H-Östradiol sind einige Bindegewebszellen und einige Fibromyozyten so stark markiert, daß sie sich von der artifiziellen Korndichte abheben. Die Anzahl der markierten Zellen und die Stärke der Markierung schwankt von Tier zu Tier. In einem Tier (E3) sind häufig stark markierte Bindegewebszellen und Fibromyozyten zu finden (Abb. 23 und Abb. 24). In drei anderen Tieren (E2, E4, E5) ist nur selten eine markierte Zelle im Bindegewebe zu beobachten. Die spezifische Markierung der Zellen dieser Tiere hebt sich noch eben von der artifiziellen Silberkorndichte ab.

Im Ductus deferens finden sich wie bei der ^{3}H-DHT-Markierung Areale von markierten und unmarkierten Myozyten. Es finden sich weniger markierte Myozyten als nach der ^{3}H-DHT-Gabe. Die Zellen der subepithelial gelegenen Bindegewebsschicht sind häufig stark markiert (Abb. 16).

In der Abbildung 1 sind die Befunde nach Gabe von ^{3}H-DHT und in Abbildung 2 nach Gabe von ^{2}H-Östradiol schematisch zusammengefaßt.

3.4 Kompetitionsexperimente

Bei den Tieren, die 0,5 µg ^{3}H-DHT und 5 µg Östradiol pro 100 g Körpergewicht oder 0,5 µg ^{3}H-Östradiol und 5 µg DHT pro 100 g Körpergewicht erhalten haben, ist kein Unterschied in der Bindung von radioaktivem Steroid gegenüber den Tieren, die nur ^{3}H-DHT oder ^{3}H-Östradiol erhalten haben, zu beobachten. Zwei dieser Tiere, (DHT 5 und 6) sind deshalb in die quantitative Auswertung der ^{3}H-DHT-Bindung in den Hauptzellen mit einbezogen.

In Tieren, die ^{3}H-DHT und die zehnfache Menge von nicht radioaktivem DHT oder ^{3}H-Östradiol und die zehnfache Menge von nicht radioaktivem Östradiol gleichzeitig erhalten haben, findet sich im Nebenhoden keine Anreicherung von Silberkörnern über Zellkernen. Die Abbildungen 17 bis 20 zeigen das Ergebnis der Kompetitionsexperimente. Es werden jeweils Aufnahmen vom Initialsegment gezeigt, da hier bei Nichtkompetitionstieren in den Hauptzellen die Markierung am höchsten ist. In den Ductuli efferentes der beiden Tiere, die ^{3}H-Östradiol und nicht radioaktives Östradiol erhalten haben, ist nach 6-monatiger Expositionszeit eine schwache Markierung zu sehen. Es korrespondiert mit der Beobachtung, daß in Tieren, die ^{3}H-Östradiol und DHT oder nur ^{3}H-Östradiol erhalten haben, bereits nach zwei Monaten eine deutliche Markierung zu beobachten ist und daß die Östradiolbindung im Ductulus efferens in allen Tieren am höchsten ist (siehe auch Abb. 19 und Tabl. 2).

3.5 ^{3}H-DHT und ^{3}H-Östradiolbindung im Nebenhoden von geschlechtsumgekehrten Tfm-Heterozygoten (Mosaiktiere)

Der Nebenhoden der Mosaiktiere besteht aus androgensensitiven und androgeninsensitiven Zellen. (Vergl. 1.8 der Einleitung). Im Epithel des Nebenhodenganges finden sich neben normal differenzierten Abschnitten Bezirke mit flachen, kubischen Epithelzellen ohne Stereoziliensaum. Diese flachen Bezirke wurden von Drews und Alonso-Lozano (1974) als Tfm-Zellklone identifiziert. Die Größe der Tfm-Zellbezirke und der Gesamtanteil an Tfm-Zellen variieren von Tier zu Tier. Im Nebenhodenkopf sind die Tfm-Zellbezirke größer und häufiger als in den anderen Nebenhodenabschnitten.

^{3}H-DHT: Haupt-, Basal-, apikale und klare Zellen zeigen in den normal differenzierten Epithelabschnitten das gleiche ^{3}H-DHT-Bindungsmuster wie im männlichen Tier. In den Tfm-Zellbezirken findet sich keine Markierung. Man beobachtet daher ein charakteristisches Bild von nicht markierten, flachen Tfm-Zellbezirken neben markierten Hauptzellen (Abb. 21 und 22).

Obwohl ich im Nebenhodenkörper keine Beladung der Hauptzellen mit ^{3}H-DHT feststellen kann, ist der androgenbedingte Unterschied in der Epithelhöhe zwischen Tfm-Zellen mit normalen Zellen zu erkennen. Der Unterschied ist jedoch sehr viel weniger ausgeprägt als im Kopf.
Im Bindegewebe des Nebenhodens sind wie in männlichen Tieren nur einige Zellen markiert. Ein Mosaik aus ^{3}H-DHT bindenden Zellbezirken und Zellbezirken, die kein ^{3}H-DHT binden, läßt sich daher nicht darstellen. Die nekrotischen Bezirke, die Drews und Dieterich (1978) nach Kurzzeitkastration beobachteten, treten in meinen Schnitten nicht in Erscheinung.

^{3}H-Östradiol: In den normal differenzierten Bezirken sind Haupt-, Basal-, apikale und klare Zellen wie im männlichen Tier markiert. Tfm-Zellen binden ^{3}H-Östradiol im Nebenhodenkopf. Im Nebenhodenkörper und -schwanz beobachtete ich keine Markierung. Sie verhalten sich somit wie Hauptzellen. Die Markierung der Tfm-Zellen ist ebenso stark wie die der umgebenden Hauptzellen (Abb. 23 und 24). Autoradiographisch lassen sich keine apikalen und klaren Zellen in Tfm-Zellbezirken erkennen. Im Bindegewebe zeigen sich wie in männlichen Tieren nur einige markierte Zellen (Abb. 23 und 24).

Diskussion:

Meine Untersuchung hat ergeben, daß sowohl ^{3}H-DHT als auch ^{3}H-Östradiol im Nebenhoden der Maus eine sehr differenzierte Verteilung der spezifischen Bindung aufweist. Für beide Hormone ist die Markierung in den Hauptzellen des Initialsegmentes am höchsten. Sie ist deutlich höher als in dem anschließenden zweiten Segment des Nebenhodenkopfes. Die Intensität der Markierung fällt im distalen Abschnitt des Nebenhodenkopfes zum Nebenhodenkörper hin ab. Im Ductulus efferens ist ebenfalls eine starke Markierung vorhanden, die mit ^{3}H-Östradiol besonders ausgeprägt ist. Im Nebenhodenkörper ist in den Hauptzellen für ^{3}H-DHT und für ^{3}H-Östradiol keine Markierung nachweisbar. In den Hauptzellen des Nebenhodenschwanzes tritt für ^{3}H-DHT wieder eine Markierung mit einem zweiten Maximum im Segment 8 auf. Mit ^{3}H-Östradiol sind die Hauptzellen im Nebenhodenschwanz dagegen nicht markiert. Die apikalen Zellen im Nebenhodenkopf und die klaren Zellen im Körper und im Schwanz zeigen eine von den Hauptzellen abweichende Markierung. Sie binden ^{3}H-DHT schwächer und ^{3}H-Östradiol stärker als die sie umgebenden Hauptzellen. Im lockeren Bindegewebe des Nebenhodens sind sowohl mit ^{3}H-DHT als auch mit ^{3}H-Östradiol nur einige Zellkerne beladen. Das übrige Bindegewebe ist nicht markiert.

Zur Bindung von ^{3}H-DHT: Bereits Stumpf und Sar (1976) zeigen autoradiographisch im Nebenhoden der Ratte nach ^{3}H-Testosterongabe eine Bindung in den Hauptzellen. Sie weisen auf eine unterschiedliche Markierung der anderen Zellarten hin. Eine genaue Beschreibung der Hormonbindung im Verlauf des Ganges erfolgt nicht. Im Gegensatz zu meinen Befunden bei der Maus finden die Autoren im Epithel des Ductus deferens der Ratte eine starke Markierung.

Biochemisch stellen Tindall et al. (1974), Gupta et al. (1974), Pujol und Bayard (1979) bei der Ratte in Nebenhodenkopf und -schwanz eine höhere DHT-Bindung als im Nebenhodenkörper fest. Ihre Daten stimmen mit der von mir autoradiographisch in den Hauptzellen gefundenen spezifischen Bindung von ^{3}H-DHT überein. Aus methodischen Gründen repräsentieren die biochemischen Messungen allerdings nur die Gesamtheit aller Zellen eines Abschnitts und lassen keine nach der Zellart differenzierte Aussage zu.

Ein Vergleich mit der Arbeit von Kanka u. Kopecny (1977) zeigt den Zusammenhang zwischen ^{3}H-DHT-Bindung und RNA- und Proteinsynthese in den Hauptzellen. Im Initialsegment, in dem die höchste, von den anderen Abschnitten deutlich unterscheidbare ^{3}H-DHT-Bindung zu beobachten ist, finden die Autoren eine hohe RNA- und Proteinsyntheserate, die sich vom distalen Nebenhodenkopf klar absetzt. Die RNA- und Proteinsynthese ist wie die ^{3}H-DHT-Bindung im distalen Nebenhodenkopf und im Nebenhodenschwanz höher als im Nebenhodenkörper. Die apikalen und klaren Zellen werden von Kanka und Kopecny nicht untersucht.

Zur Bindung von ^{3}H-Östradiol: Die ^{3}H-Östradiolbindung ist in den Hauptzellen des Nebenhodenkopfes der ^{3}H-DHT-Bindung ähnlich. In den Hauptzellen des Nebenhodenschwanzes ist dagegen eine ^{3}H-DHT-Bindung, aber keine ^{3}H-Östradiolbindung zu beobachten. Dies ist ein Hinweis dafür, daß ^{3}H-Östradiol nicht an den Androgenrezeptor bindet, sondern einen eigenen Rezeptor besitzt.

Stumpf und Sar (1976) beschreiben im Nebenhodenepithel der Ratte nur eine schwache Östradiolbindung. Sie differenzieren nicht nach Hauptzellen, Basalzellen, apikalen und klaren Zellen. Da die Autoren nicht angeben, in welchem Abschnitt des Nebenhodens sie diesen Befund erhoben haben, läßt sich nicht sagen, ob im Gegensatz zur Maus, die Ratte im gesamten Nebenhodenepithel wenig Östradiol bindet, oder ob die Autoren nur Abschnitte ohne Östradiolbindung in den Hauptzellen betrachtet haben.

Das Verhalten der apikalen und klaren Zellen

In meinen Befunden binden apikale und klare Zellen ^{3}H-DHT schwächer als die Hauptzellen des distalen Nebenhodenkopfes. Moore und Bedford (1979a) beobachten, daß die apikalen und klaren Zellen ihre Zellstruktur innerhalb von 14 Tagen nach Kastration im wesentlichen nicht ändern. Daher scheinen sie nicht androgenabhängig zu sein. Brown und Montesano (1981) stellen eine gegenüber Hauptzellen höhere Dichte an intramembranalen Partikeln in Vakuolen dieser Zellen fest. Sie vermuten, daß apikale und klare Zellen miteinander verwandt sind. Diese Vermutung wird durch meine Beobachtung einer ausgeprägten ^{3}H-Östradiolbindung in beiden Zellarten unterstrichen. Östradiol spielt möglicherweise bei der gegenüber den Hauptzellen erhöhten Proteinresorption (Moore und Bedford 1979b) eine Rolle.

Die basalen Zellen

In den Basalzellen finde ich weder eine ^{3}H-DHT noch eine ^{3}H-Östradiol-Bindung. Die Funktion der Basalzellen ist unbekannt. Meine Beobachtungen weisen darauf hin, daß sie keine Androgen- bzw. Östrogenzielzellen sind.

Zur Markierung im Bindegewebe

Im Bindegewebe von Nebenhodenkopf- und schwanz finden sich nach ^{3}H-DHT oder ^{3}H-Östradiolgabe einzelne sicher markierte Zellen. Das Ausmaß der Markierung ist im Vergleich zu den Hauptzellen sehr variabel. Es sind wesentlich weniger Bindegewebszellen als Hauptzellen markiert.

Man muß daher davon ausgehen, daß bei biochemischen Bestimmungen der spezifischen Bindung von Androgenen im Nebenhoden im wesentlichen die Bindungskapazität der Hauptzellen im Nebenhodengang nachgewiesen wird.

Stumpf und Sar (1976) beschreiben eine Bindung von ^{3}H-Östradiol in Fibroblasten vieler Organe. Sie weisen auf eine mögliche Rolle des Östradiols bei der Kollagensynthese hin.

Die Markierung im Ductus deferens

Im Ductus deferens der Maus finden sich in den Zellen der subepithelial gelegenen Bindegewebsschicht sowohl eine ^{3}H-DHT als auch eine ^{3}H-Östradiolbindung. Die Epithelzellen sind nicht markiert.

Hamilton et al. (1969) beobachten nach Kastration eine drastische Reduktion der Membrankonvolute (whorled membranes) in den Epithelzellen des Ductus deferens der Maus, die nach Androgensubstitution reversibel ist. Die Menge an "whorled membranes" ist ein Ausdruck für den Sekretionszustand der Zellen. Für die Quantifizierung der Androgenabhängigkeit sind Messungen der RNA-Syntheserate oder der Zellkerngröße besser geeignet. Wahrscheinlich besteht ein so geringer Androgenrezeptorgehalt in den Epithelzellen, daß sie mit der angewandten Methode nicht nachzuweisen ist.

In den Muskelzellkernen des Ductus deferens bindet sowohl ^{3}H-DHT als auch ^{3}H-Östradiol. Dies weist auf eine mögliche Einwirkung beider Hormone auf die Pulsationswelle beim Spermientransport hin.

Zum Ausfall der Kompetitionsexperimente

Meine Kompetitionsexperimente zeigen, daß die von mir beschriebene Markierung auf einer spezifischen Bindung von ^{3}H-DHT und von ^{3}H-Östradiol beruht. Ein zehnfacher Überschuß von Östradiol verdrängt die ^{3}H-Östradiolbindung, aber nicht die ^{3}H-DHT-Bindung im Zellkern. Umgekehrt ist keine Beeinflussung der ^{3}H-Östradiolbindung durch einen zehnfachen Überschuß von DHT zu beobachten, während dieselbe Menge DHT ^{3}H-DHT aus der Kernbindung verdrängt.

Eine nennenswerte Kreuzreaktion von ^{3}H-DHT an den Östrogenrezeptor und umgekehrt von ^{3}H-Östradiol an den Androgenrezeptor findet in meinem Experiment nicht statt.

Tindall et al. (1981) stellen nach Gabe von 250 µg Östradiol pro 100 g Körpergewicht im Nebenhoden der Ratte eine Hemmung der DHT-Bindung fest. Da Fang und Liao (1969) eine schwache Bindung von Östradiol an den Androgenrezeptor beschreiben, handelt es sich bei diesem Befund am wahrscheinlichsten um eine unspezifische Östradiolbindung an den Androgenrezeptor bei großem Konzentrationsunterschied zwischen DHT und Östradiol (1:1000 gegenüber 1:10) in meinem Experiment.

Die Bedeutung der Chemographie

Bei der Autoradiographie kann es zu einer unspezifischen, d.h. nicht durch radioaktiven Zerfall bedingten, Silberionenreduktion kommen. Dies kann beim Aufbringen des Schnittes auf den Objektträger, bei der Exposition und bei der Entwicklung geschehen (positive Chemographie). Durch selektives Auftreten über den Zellkernen kann ein falsch positiver Befund erzeugt werden. Ein Auftreten im Interstitium und im Zytoplasma schränkt die Identifizierung einer spezifischen Kernbindung eines radioaktiven Steroidhormons ein.

Positive Chemographie durch das Aufbringen des Schnittes auf den Objektträger wird durch eine sich unmittelbar an das Aufbringen anschließende Entwicklung der Photoemulsion geprüft. In meinem Experiment zeigt sich bei sofortiger Entwicklung eine hohe Silberkorndichte über dem Bindegewebe. Sie ist also durch positive Chemographie bedingt. Dies schränkt das Erkennen von Steroidzielzellen im Bindegewebe ein. Im Epithel findet sich nur eine sehr geringe Silberkörnerzahl nach sofortiger Entwicklung.

Das Ausmaß der Chemographie während der Exposition der Schnitte habe ich anhand der Schnitte von Tieren überprüft, die radioaktives Hormon und die zehnfache Menge des gleichen radio-inerten Hormones erhalten hatten. Nach einer Expositionszeit von fünf Monaten findet sich im Gegensatz zu Tieren, die nur radioaktives Hormon erhalten haben, das gleiche Ausmaß an positiver Chemographie wie in Schnitten, die unmittelbar nach dem Aufbringen auf den Objektträger entwickelt worden sind. Da die von mir beobachtete positive Chemographie nicht über dem Epithel des Nebenhodenganges und nicht über Zellkernen auftrat, darf ich davon ausgehen, daß die Silberkörner über den Zellkernen durch den Zerfall des spezifisch im Zellkern gebundenen, radioaktiven Hormons entstanden sind.

Bereits reduzierte Silberionen können während der Expositionszeit wieder oxidiert werden. Dieser Vorgang wird "fading" oder negative Chemographie genannt. Meine Objektträger sind nach verschiedenen Expositionszeiten, beginnend mit einem Monat, entwickelt worden. Es findet sich nirgendwo eine Abnahme der Silberkörnerzahl über dem Bindegewebe und dem Epithel. In den Zellkernen von Zielzellen nimmt die Markierung kontinuierlich zu. Somit wird mein Experiment nicht durch negative Chemographie beeinträchtigt.

Beobachtungen im Nebenhoden der Mosaiktiere

Meine Beobachtungen im Mosaik-Nebenhoden von geschlechtsumgekehrten, für Tfm-heterozygoten Mäusen zeigen, daß in den flachen androgeninsensitiven Tfm-Bezirken die Zellen mit ^{3}H-DHT nicht markiert sind. Die Markierung mit ^{3}H-Östradiol ist dagegen ebenso stark ausgeprägt wie in den benachbarten Hauptzellen.

Meine Beobachtung zeigt, daß die Androgenunempfindlichkeit der Tfm-Zellen mit der Unfähigkeit einhergeht, das Androgen spezifisch zu binden. Sie bestätigt die biochemischen Befunde von Gehring und Tomkins (1974) und Attardi und Ohno (1974). Beide Arbeitsgruppen

beobachten in einer biochemischen Bindungsstudie an Nierengewebe von testikulär feminisierten Mäusen, daß die Tfm-Mutation mit einem Defekt bei der spezifischen Bindung von Androgenen verbunden ist. Beide Arbeitsgruppen stellen jedoch im Tfm-Gewebe eine Restbindung von etwa 10 - 25% fest. Diese Restbindung tritt in den Tfm-Zellen im Nebenhodenmosaik nicht auf. Meine Beobachtung weist daher darauf hin, daß die Tfm-Mutation mit einem vollständigen Rezeptordefekt verbunden ist.

Das vollständige Fehlen einer Markierung der Tfm-Zellen mit ^{3}H-DHT bei gleichzeitig vorhandener normaler Markierung der Hauptzellen mit ^{3}H-DHT im Nebenhodenkopf und -schwanz ist auf der anderen Seite ein klarer Hinweis für die Aussagekraft der autoradiographischen Methode nach Stumpf. Es besteht im Nebenhodenkopf und - schwanz eine direkte Korrelation zwischen Fehlen der Markierung und Androgeninsensitivität in den Tfm-Zellen und Androgenabhängigkeit sowie deutlicher Markierung mit ^{3}H-DHT in den benachbarten Hauptzellen.

Im Nebenhodenkörper läßt sich das Mosaik aus differenzierten Zellbezirken und undifferenzierten Tfm-Zellbezirken zwar morphologisch, nicht aber autoradiographisch darstellen, da die Hauptzellen nicht markiert sind. Dies stellt einen Gegensatz zwischen morphologischer und autoradiographischer Beobachtung dar, wobei, wie beim Epithel des Ductus deferens, ein geringer, autoradiographisch nicht darstellbarer Androgenrezeptorgehalt der Zellen diskutiert werden kann.

Die Beobachtung, daß die Tfm-Zellen sehr wohl ^{3}H-Östradiol, aber nicht ^{3}H-DHT binden, ist ein weiterer Hinweis für die Spezifität der von mir nachgewiesenen ^{3}H-DHT und ^{3}H-Östradiolbindung. Die ^{3}H-Östradiolbindung in den Tfm-Zellen entspricht auch quantitativ der in den Hauptzellen. Ich darf daher annehmen, daß der Rezeptor für Östradiol in den Nebenhodenzellen nicht direkt androgenabhängig ist und in beiden Zellarten der Rezeptor im wesentlichen von den gleichen Faktoren beeinflußt wird.

Drews und Alonso-Lozano (1974) folgern aus der Tatsache, daß die Tfm-Zelle des Nebenhodenepithels morphologisch nicht differenziert ist, daß es sich um eine embryonale Zelle handelt. Die embryonale Epithelzelle des Wolffschen Ganges bindet am Tag 16 der Schwangerschaft bei der Maus kein Östrogen (Stumpf et al. 1980). Die spezifische Markierung der Tfm-Zelle mit ^{3}H-Östradiol zeigt, daß die Zelle zur Synthese eines spezifischen Produktes, des Östrogenrezeptors, in der Lage ist. Es handelt sich also nicht um "embryonale Zellen".

Schlußfolgerungen

Die autoradiographische Lokalisation von ^{3}H-Dihydrotestosteron und von ^{3}H-Östradiol im Epithel des Nebenhoden der Maus zeigt, daß für Androgene und für Östrogene ein differenziertes Muster der spezifischen Bindung im Epithel vorliegt. Der Nebenhoden unterscheidet sich in dieser Beziehung von der Samenblase und der ventralen Prostata, die eine uniforme Lokalisation der spezifischen Bindung beider Steroidhormone im Epithel aufweisen (Stumpf und Sar 1976 und eigene Beobachtungen).

Androgene und Östrogene zeigen im Nebenhoden ein unterschiedliches Muster der spezifischen Bindung. Dies weist, ebenso wie meine Kompetitionsexperimente, darauf hin, daß gesonderte Östrogenrezeptoren mit einem eigenen Wirkungsspektrum vorhanden sind.

Im Nebenhoden von geschlechtsumgekehrten, für Tfm heterozygoten Mäusen ist ein Mosaik aus androgenunempfindlichen Tfm-Zellen und normalen Zellen vorhanden. In den Tfm-Zellbezirken findet sich keine spezifische Bindung von ^{3}H-DHT, jedoch eine Bindung von ^{3}H-Östradiol die das gleiche Ausmaß wie in den umgebenden Hauptzellen erreicht. Mein Experiment bestätigt die bereits in biochemischen Bindungsstudien an der Niere gemachte Beobachtung, daß Tfm-Zellen einen Defekt bei der spezifischen Bindung von Androgenen aufweisen. Die biochemisch gemessene Restbindung von 10 bis 25% tritt bei meinem autoradiographischen Nachweis nicht in Erscheinung.

Die Darstellung der spezifischen Bindung von ^{3}H-DHT und von ^{3}H-Östradiol im Nebenhoden des Mosaiktieres ist ein augenfälliger Beweis für die Aussagekraft der autoradiographischen Methode. Die spezifische Bindung von ^{3}H-Östradiol in den Tfm-Zellen zeigt, daß die Zellen so weit differenziert sind, daß sie zur Synthese eines Östradiol-Bindungsproteins fähig sind.

Tabelle 1

Versuchstiere:

Tiernummer	Genotyp	Alter	Injizierte Verbindung
DHT 1	Ta/+ - Sxr	110 d	^{3}H-DHT
DHT 2	Ta/+ - Sxr	70 d	^{3}H-DHT
DHT 3	Ta/Y	80 d	^{3}H-DHT + DHT
DHT 4	+/Y	70 d	^{3}H-DHT + DHT
DHT 5	Ta/Y	80 d	^{3}H-DHT + E_2
DHT 6	+/Y	70 d	^{3}H-DHT + E_2
DHT 7	Tfm/+ - Sxr	130 d	^{3}H-DHT
DHT 8	Tfm/+ - Sxr	130 d	^{3}H-DHT
DHT 9	Tfm/Ta - Sxr	70 d	^{3}H-DHT
DHT 10*	Tfm/Ta - Sxr	50 d	^{3}H-DHT
E 1	Ta/+ - Sxr	100 d	^{3}H-E_2
E 2	+/+ - Sxr	70 d	^{3}H-E_2
E 3	Tfm/Ta - Sxr	100 d	^{3}H-E_2
E 4	Tfm/Ta - Sxr	80 d	^{3}H-E_2
E 5	Tfm/Ta - Sxr	80 d	^{3}H-E_2
E 6	Tfm/Ta - Sxr	120 d	^{3}H-E_2 + E_2
E 7	Tfm/+ - Sxr	110 d	^{3}H-E_2 + E_2
E 8	Tfm/+ - Sxr	130 d	^{3}H-E_2 + DHT
E 9	Tfm/+ - Sxr	100 d	^{3}H-E_2 + DHT

Abkürzungen:

^{3}H-DHT: radioaktiv markiertes Dihydrotestosteron;
^{3}H-E_2: radioaktiv markiertes Östradiol;
Tfm: X-chromosomal gebundene, androgeninsensitive Mutation (testikulare Feminisierung), war mit dem Fellfarbenmarker Blotchy gekoppelt;
Ta: X-chromosomal gebundener Fellfarbenmarker Tabby;
+: Wildtyp;
Sxr: sex reversed, dominanter, geschlechtsumkehrender Faktor
* Im Tier DHT 10 war der Nebenhoden durch eine Entzündung so schwer verändert, daß die normale Struktur nicht mehr zu erkennen war. Das Tier wurde daher nicht ausgewertet.

Tabelle 2

Anzahl der Silberkörner über den Zellkernen von Hauptzellen im Nebenhoden de Maus nach Gabe von ^{3}H-Dihydrotestostoron und ^{3}H-Östradiol

	Tiere	DHT 1	DHT 2	DHT 5	DHT 6	E 2
Ductulus efferens				10 ± 4		42 ± 8
Initialsegment 1		12 ± 4	20 ± 4	12 ± 4	22 ± 5	27 ± 7
Distales Caput	2 Segm.	8 ± 4	10 ± 4	9 ± 3	17 ± 5	16 ± 5
	3 Segm.	9 ± 4	11 ± 4	7 ± 4	9 ± 3	11 ± 4
	4 Segm.	6 ± 4	9 ± 4	4 ± 2	7 ± 2	7 ± 2
Corpus	5 Segm.	2 ± 2	4 ± 2	2 ± 2	3 ± 2	2 ± 2
	6 Segm.	4 ± 3	4 ± 3	3 ± 2	2 ± 2	2 ± 2
Cauda	7 Segm.	12 ± 5	10 ± 4	6 ± 3	11 ± 3	2 ± 2
	8 Segm.	17 ± 7	15 ± 4	8 ± 3	14 ± 3	2 ± 2
	9 Segm.	8 ± 4	11 ± 5	5 ± 2	10 ± 3	3 ± 3
	10 Segm.	3 ± 2	6 ± 3		5 ± 2	2 ± 2
D. deferens		3 ± 2	2 ± 2		2 ± 2	

Durchschnittliche Anzahl der Silberkörner pro Zellkern, errechnet aus 50 Zellkernen pro Segment.

Abb. 1 und 2

Die Abbildungen wurden nach einem repräsentativen Kryostatschnitt mit dem Zeichenspiegel vom mikroskopischen Bild abgezeichnet. Das außerhalb des Nebenhodens gelegene Konvolut des Ductulus efferens und der Nebenhoden in seiner gesamten Ausdehnung sowie ein Teil des Ductus deferens sind dargestellt. Die Läppchengrenzen, die zur Segmentunterteilung des Nebenhodens verwendet wurden, sind dick gestrichelt eingezeichnet. Aus jedem Segment ist ein Ausschnitt des Nebenhodenganges herausgezeichnet und mit der entsprechenden Segmentnummer versehen. Die in diesem Segment enthaltenen Befunde sind schematisch eingezeichnet.
Abbildung 1 zeigt die ^{3}H-DHT Markierung;
Abbildung 2 zeigt die ^{3}H-Östradiol Markierung.

Abkürzungen:
d.eff. = Ductulus efferens;
d.def. = Ductus deferens;

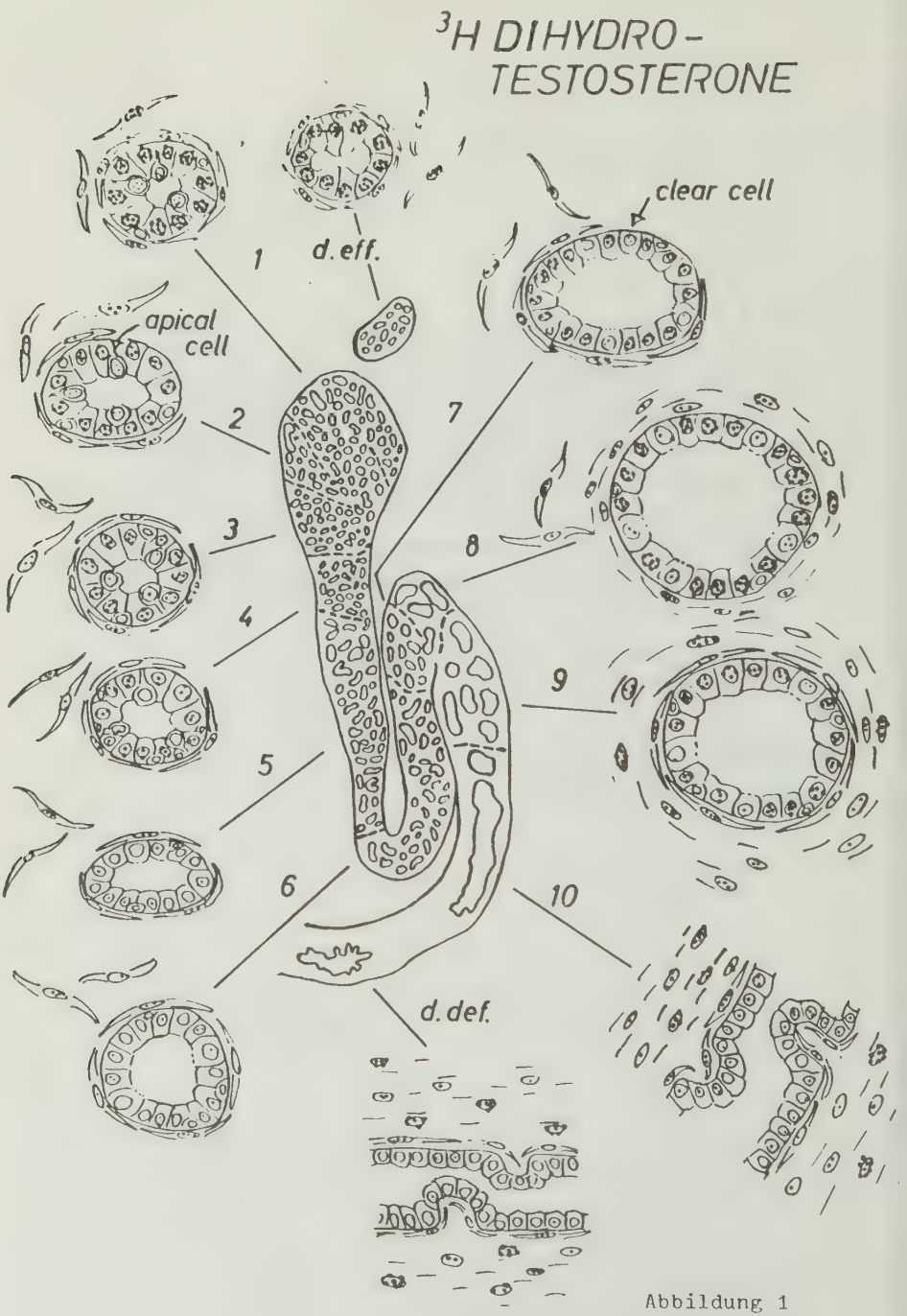

^{3}H DIHYDRO-
TESTOSTERONE
clear cell
d. eff.
apical
cell
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
d. def.

Abbildung 1

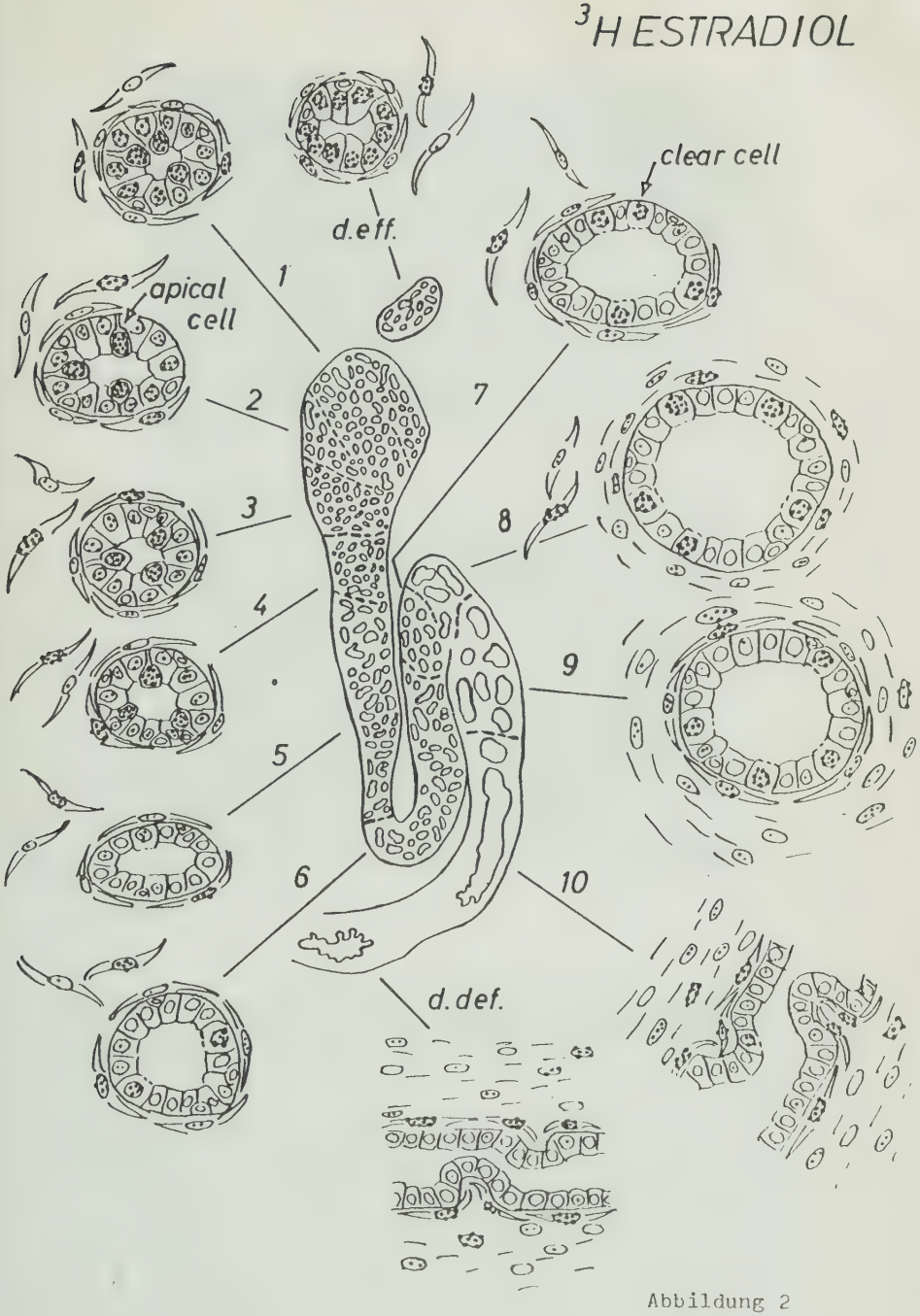
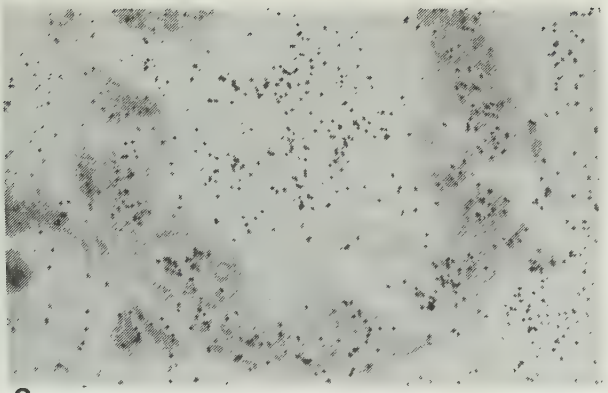
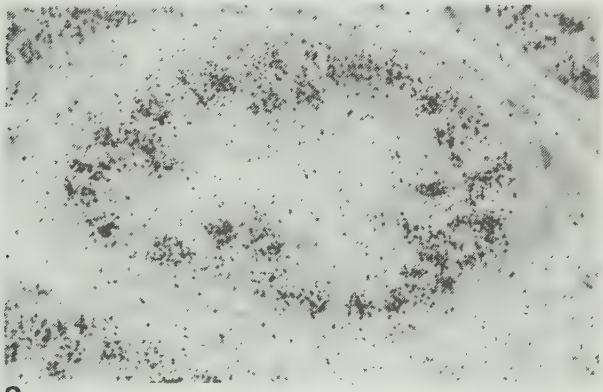


Abbildung 2

Die Abb. 3 bis 16 zeigen die Befunde nach Gabe von ^{3}H-Dihydrotestosteron (^{3}H-DHT) bzw. ^{3}H-Östradiol (^{3}H-E_2).
Auf den Seiten ist oben der Befund nach ^{3}H-DHT-Gabe und unten der Befund nach Gabe von ^{3}H-E_2 im gleichen Nebenhodenabschnitt dargestellt.
Die Expositionszeit der Schnitte beträgt 5 Monate.
MGP = Methylgrün-Pyroninfärbung
MBBF = Methylenblau-Basisches Fuchsin-Färbung



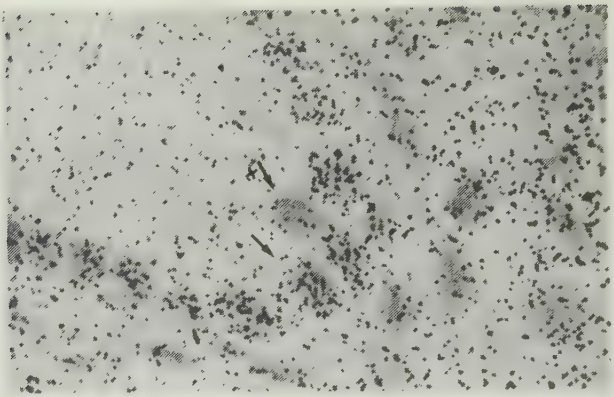
^{3}H-DHT



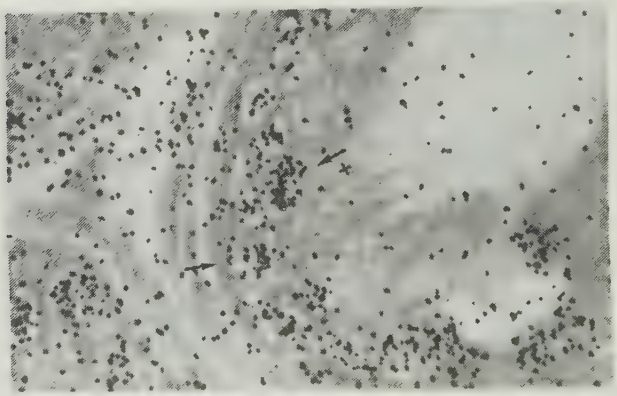
^{3}H-E_2

Abb. 3
Ductulus efferens: Das Epithel zeigt eine wellenförmige Oberfläche zum Lumen hin. Die isoprismatischen bis hochprismatischen Epithelzellen sind markiert.
x 2000 MGP

Abb. 4
Ductulus efferens: Das Epithel ist sehr stark markiert.
x 2000 MBBF



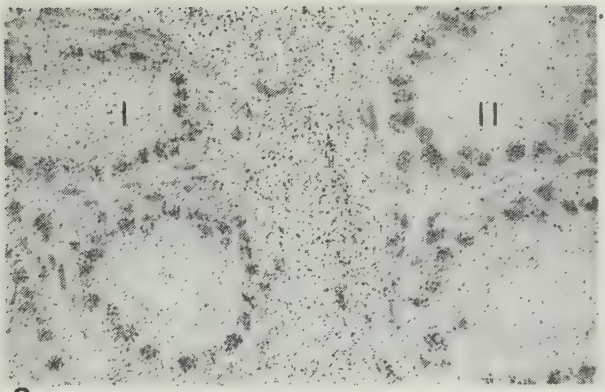
^{3}H-DHT



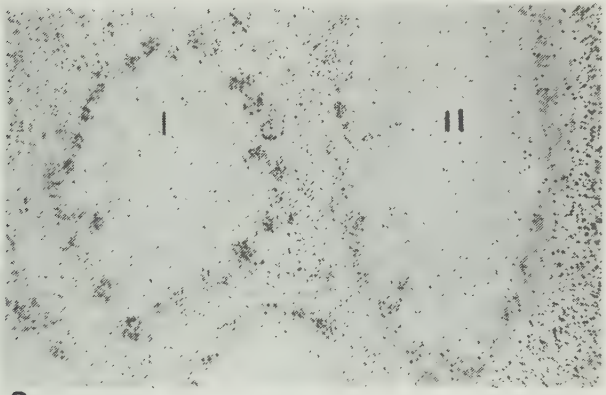
^{3}H-E_2

Abb. 5
Segment 1: Die Hauptzellen (↕) sind deutlich markiert.
Der Zellkern der apikalen Zelle (↕+) zeigt keine Beladung. Markierte Bindegewebszellen sind in diesem Bild nicht zu sehen.
x 2000 MGP

Abb. 6
Segment 1: Die Hauptzellen (↕) sind stark markiert, die Markierung der apikalen Zellen (↕+) ist noch stärker als die der Hauptzellen.
x 2000 MBBF



^{3}H-DHT



^{3}H-E_2

Abb. 7
Grenze zwischen 1. und 2. Segment: Die Kernbeladung im 1. Segment (Initialsegment) ist deutlich höher als im 2. Segment.
Der Nebenhodengang ist im 1. Segment mit I und im folgenden 2. Segment mit II bezeichnet.
x 850 MGP

Abb. 8
Grenze zwischen 1. und 2. Segment: Mit H^3-E_2 stellt sich der Unterschied zwischen beiden Segmenten in gleicher Weise dar. Der scheinbare Intensitätsunterschied in der Markierung gegenüber der Abb. 7 ist nicht durch die Zahl der Silberkörner, sondern durch die unterschiedliche Kernfärbung bedingt.
x 850 MBBF

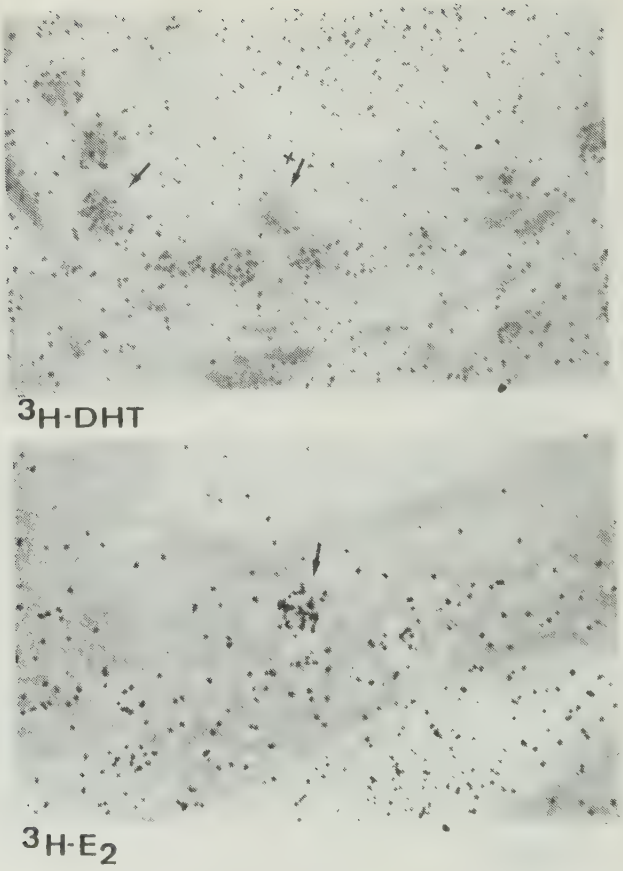
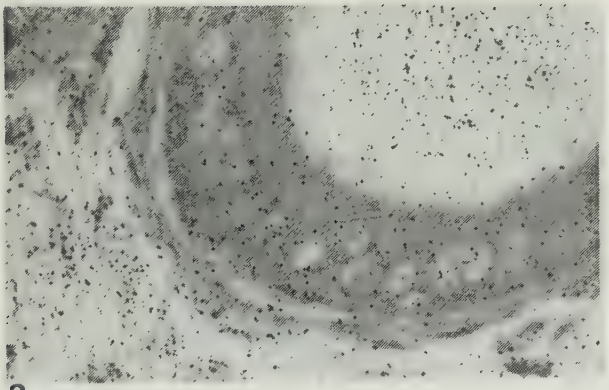
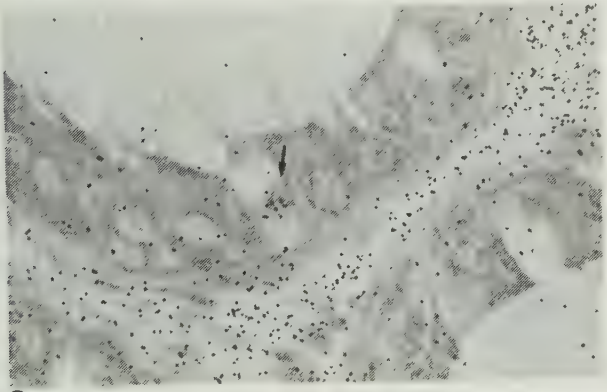


Abb. 9
Segment 3 (distales Caput epididymidis): Das Bild stellt die unterschiedlichen Markierungen von Hauptzellen (↑) und apikalen Zellen (↑+) dar. Während die Hauptzellkerne eine ^{3}H-DHT-Beladung zeigen, findet sich in den apikalen Zellen keine Markierung mehr. Basalzellen sind ebenfalls nicht markiert.
x 2000 MGP

Abb. 10
Segment 4 (distales Caput epididymidis): Die Hauptzellkerne sind nur wenig beladen. Apikale Zellen (↑) zeigen dagegen eine deutliche Markierung.
x 2000 MBBF



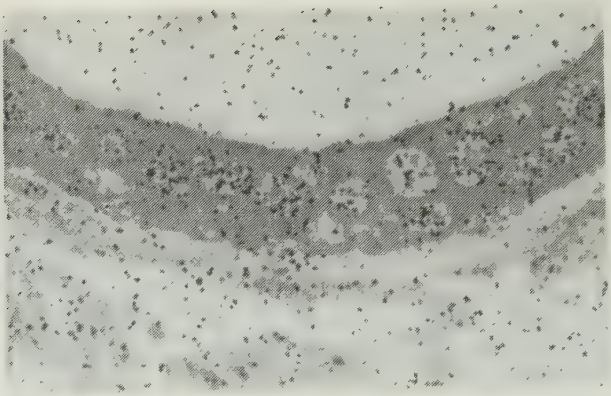
^{3}H-DHT



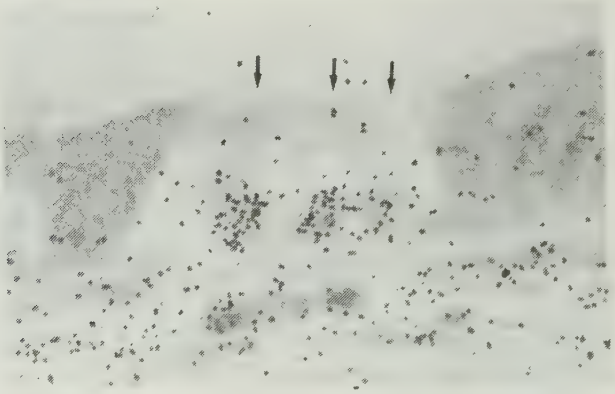
^{3}H-E_2

Abb. 11
Segment 6 (Corpus epididymidis): Im Nebenhodenkörper findet sich keine ^{3}H-DHT-Markierung.
x 1400 MBBF

Abb. 12
Segment 5 (Corpus epididymidis): Bereits zu Beginn des Nebenhodenkörpers zeigt sich eine, wenn auch geringe, ^{3}H-E_2-Markierung in den klaren Zellen (↑). Die Hauptzellen sind nicht markiert.
x 1400 MBBF



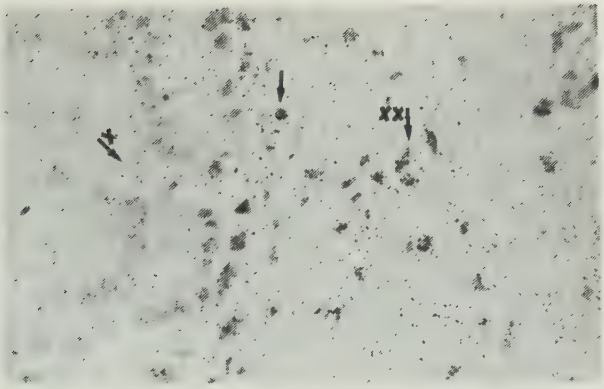
^{3}H-DHT



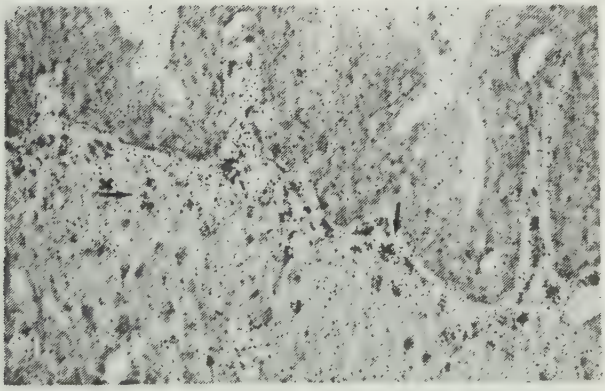
^{3}H-E_2

Abb. 13
Segment 9 (Cauda epididymidis): Auf diesem Bild erkennt man bereits die für den Ductus deferens charakteristische subepitheliale Bindegewebsschicht. Die Markierung der Hauptzellen erreicht bereits im vorhergehenden Segment 8 ein zweites Maximum.
x 2000 MBBF

Abb. 14
Segment 8 (Cauda epididymidis): Die Hauptzellen zeigen keine Markierung. Dagegen sind drei klare Zellen (↑) deutlich markiert.
x 2000 MBBC



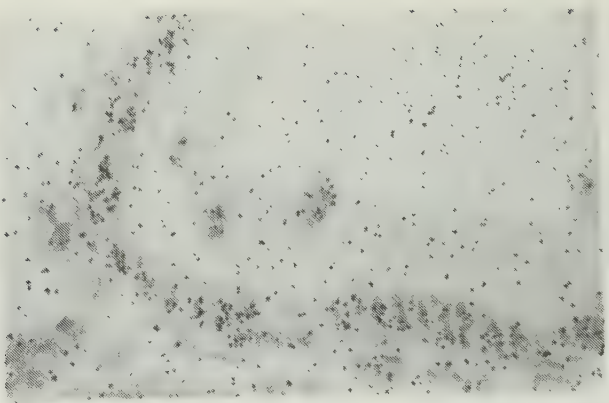
^{3}H-DHT



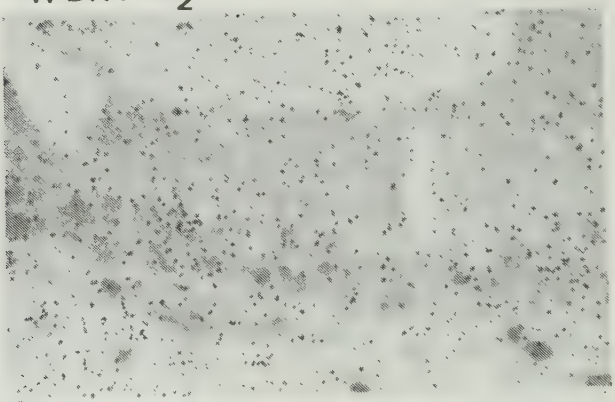
^{3}H-E_2

Abb. 15
Ductus deferens
Die Epithelzellkerne (↑x) sind nicht beladen. Subepithelial sind einige Bindegewebszellen markiert (↑). Die Muskelzellkerne (↑xx) sind beladen.
x 850 MGP

Abb. 16
Ductus deferens
Epithelzellen sind nicht markiert. Subepitheliale Bindegewebszellen (↑) zeigen eine Markierung. Einige Muskelzellkerne (↑x) sind beladen.
x 500 MBBF



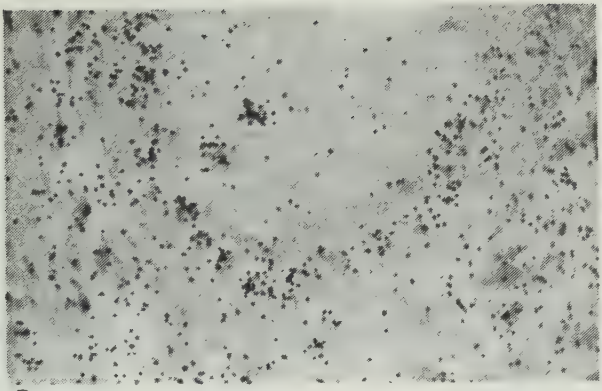
^{3}H-DHT+E_2



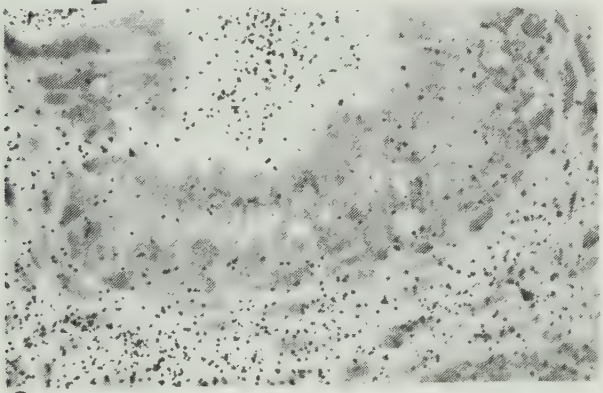
^{3}H-DHT+DHT

Abb. 17:
Die ^{3}H-DHT-Bindung in den Zellkernen - dargestellt im Initialsegment - wird bei gleichzeitiger Gabe eines Überschusses von nicht radioaktivem E_2 nicht verdrängt.
x 1400, MGP, 5 Monate Expositionszeit

Abb. 18:
Die ^{3}H-DHT-Bindung in den Zellkernen - dargestellt im Initialsegment - wird bei gleichzeitiger Gabe eines Überschusses von nicht radioaktivem DHT verdrängt.
x 1400, MGP, 5 Monate Expositionszeit



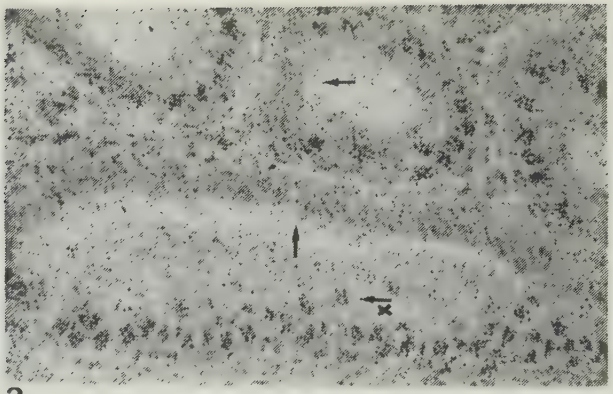
$^3H\text{-}E_2 + DHT$



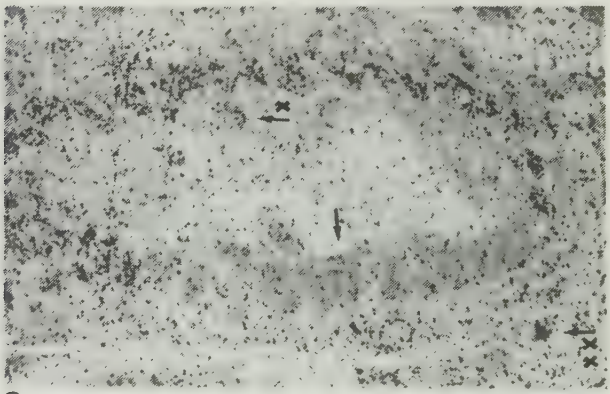
$^3H\text{-}E_2 + E_2$

Abb. 19:
Die $^3H\text{-}E_2$ Bindung in den Zellkernen - dargestellt im Initialsegment - wird bei gleichzeitiger Gabe eines Überschusses von nicht radioaktivem DHT nicht verdrängt.
x 1400, MGP, 2 Monate Expositionszeit

Abb. 20:
Die $^3H\text{-}E_2$ Bindung in den Zellkernen - dargestellt im Initialsegment - wird bei gleichzeitiger Gabe eines Überschusses von nicht radioaktivem E_2 verdrängt.
x 1400, MBBF, 6 Monate Expositionszeit

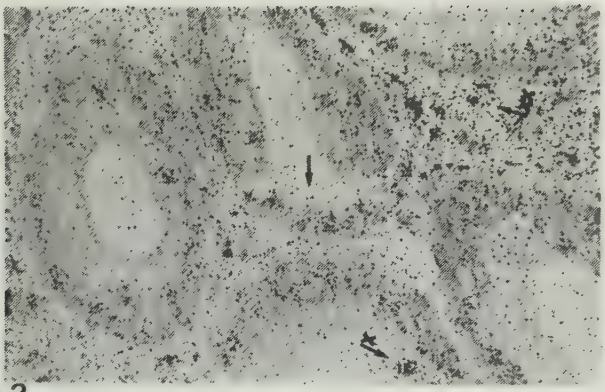


^{3}H-DHT

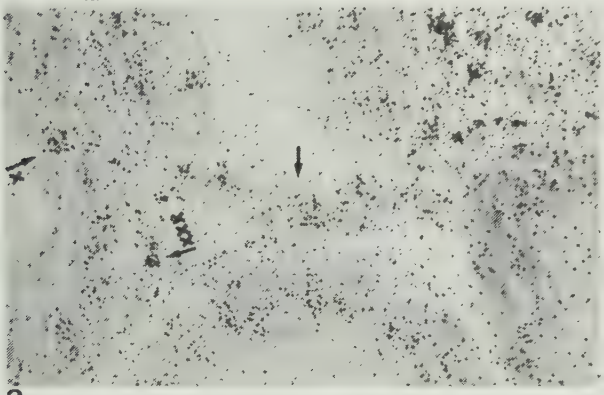


^{3}H-DHT

Abb. 21 und 22
Die Bilder zeigen die Befunde im Nebenhodenkopf der Mosaiktiere nach ^{3}H-DHT Gabe.
Im Epithel des Nebenhodenkopfes finden sich Bezirke mit flachen Tfm-Zellen (↑), die nicht markiert sind, neben den markierten Hauptzellen. Die apikalen Zellen (↑x) haben keine oder nur eine sehr geringe Markierung.
Einzelne Bindegewebszellen (↑xx) sind markiert.
21: x 1350, MGP, 5 Monate Expositionszeit
22: x 2000, MGP, 5 Monate Expositionszeit



^3H-E_2



^3H-E_2

Abb. 23 und 24
Die Bilder zeigen die Befunde im Nebenhodenkopf des Mosaiktieres nach ^3H- E_2-Gabe.
Im Epithel sind sowohl die hochprismatischen Hauptzellen, als auch die flachen Tfm-Zellen (↑) markiert. Apikale Zellen (↑x) zeigen wie im männlichen Tier eine stärkere Markierung als die Hauptzellen.
In diesem Tier findet sich weiterhin eine starke Beladung von Kernen des Bindegewebes (↑xx) und der Fibromyozyten, die das Epithel umgeben (↑xxx).
23: x 1350, MGP, 5 Monate Expositionszeit
24: x 2000, MGP, 5 Monate Expositionszeit

Zusammenfassung

Die Lokalisation von ^{3}H-Dihydrotestosteron (^{3}H-DHT) und ^{3}H-Östradiol (^{3}H-E_2) im Nebenhoden der Maus wird mit der wasserfreien Gefrierschnittautoradiographie nach STUMPF dargestellt.

Mit ^{3}H-DHT findet sich im Epithel des Ductulus efferens und in den Hauptzellen des Nebenhodenkopfes eine starke Markierung, die zum Corpus hin abnimmt und in der Cauda erneut ansteigt.

Mit ^{3}H-E_2 findet sich im Epithel des Ductulus efferens ebenfalls eine starke Markierung. Sie ist im Caput hoch und nimmt zum Corpus hin ab, steigt aber im Gegensatz zur ^{3}H-DHT-Bindung in der Cauda nicht mehr an.
Die spezialisierten sekretorischen Zellen im Nebenhodenepithel, die apikalen und die klaren Zellen zeigen eine auffallend hohe Markierung mit ^{3}H-E_2, jedoch nur eine geringe Markierung mit ^{3}H-DHT.

Kompetitionsexperimente mit einem Überschuß an nicht radioaktiv markiertem Hormon zeigen, daß DHT nur ^{3}H-DHT und E_2 nur ^{3}H-E_2 aus seiner Bindung verdrängt.

Im Nebenhodenepithel von geschlechtsumgekehrten, für die Tfm-Mutation (testikuläre Feminisierung) heterozygoten Mäusen findet sich ein Mosaik aus androgeninsensitiven Tfm-Zellen und normalen Zellen. Die Tfm-Zellen zeigen, wie erwartet, selektiv keine Markierung mit ^{3}H-DHT. Sie binden jedoch ^{3}H-E_2 wie die übrigen Hauptzellen.

Die spezifische Bindung von ^{3}H-DHT weist im Nebenhoden ein differenziertes Muster auf zellulärer Ebene auf. Für ^{3}H-E_2 sind ebenfalls spezifische Bindungsstellen vorhanden. Ihre charakteristische Lokalisation, die Kompetitionsexperimente und die Bindung in Tfm-Zellen zeigen, daß es sich um eigenständige Östradiolrezeptoren handelt.

Attardi B., Ohno S.:
Cytosol androgen receptor from kidney of normal and testicular feminized (Tfm) mice. Cell 2: 205 - 212 (1974)

Benoit J.:
Recherches anatomiques, cytologiques et histophysiologiques sur les voies excretrices du testicule chez les mammiferes.
Arch. Anat. Strasbourg 5 : 173 - 412 (1926)

Blondeau J. P., Corpechot C., le Grascogne C., Baulieu E.E., and Robel P.:
Androgen receptors in the rat ventral prostate an their hormonal control. Vit. Horm. 33: 319 - 345 (1975)

Brown D. and Montesano B.:
Membrane specialization in the rat epididymis
II The clear cell. Anat. Rec. 201: 477 - 483 (1981)

Cattanach B.M., Pollard C.E., Hawkes S.G.:
Sex reversed mice: XX and XO males. Cytogenetics 10: 319 - 337 (1971)

Drews U.:
Direct and mediated effects of testosterone: the development of intersexes in sex-reversed mice, heterozygous for testicular feminization. Anat. Embryol. 146: 325 - 340 (1975)

Drews U. and Alonso-Lozano, V.:
X-inactivation pattern in the epididymis of sex-reversed mosaic mice heterozygous for testicular feminization. J. Embryol. exp. Morph. 32,1: 217 - 225 (1974)

Drews U. and Dieterich H.J.:
Cell death in the epididymis of sex reversed mosaic mice, heterozygous for testicular feminization. Anat. Embryol. 152: 193 - 203 (1978)

Fang S. und Liao S.:
Dihydrotestosterone binding by androphilie proteins of the rat ventral prostate. Mol. Pharmacol. 5: 428 (1969)

Flüchter S.H., Moeller H., Oettling G., Rumschik U., Stingel R., Schmitz-Moormann P., Gupta D., Bichler K.-H.:
Gleichzeitige Bestimmung von Androgen-, Oestrogen- und Gestagenrezeptoren in entdifferenziertem Prostatakarzionomgewebe. Eingeschränkte Verwendbarkeit von TUR-Spänen.
in: Experimentelle Urologie, Weißbach L.L., Hartmann R., Hauri B., Baur H.W., (Hrs) (in Druck)

Flickinger C.J.:
Regional differences in synthesis, intracellular transport, and secretion of protein in the mouse epididymis.
Biol. Reprod. 25: 871 - 883 (1981)

Gehring U., Tomkins G.M.:
Characterization of a hormone receptor defect in the androgen insensitivity mutant. Cell 3: 59 - 64 (1974)

Gupta G., Rajalakshmi M., Prasad, M.R.N.:
Regional differences in androgen thresholds of the epididymis of castrated rat. Steroids 24: 575 - 584 (1974)

Hamilton D.W., Jones A.L., Fawcett D.W.:
Cholesterol biosynthesis in the mouse epididymidis and ductus deferens: A morphological study.
Biol. Reprod. 1: 167 - 184 (1969)

Hamilton D.W.:
The mammalian epididymis. In Reproductive Biology, Exerpta Medica, Amsterdam: 268 - 337; Hrs.: H. Balin and S. Glassner (1972)

Hoffer A.P. und Greenberg J.:
The structure of the epididymidis, efferent ductules and ductus deferens in the guinea pig. A light microscope study.
Anta. Rec. 190: 659 - 678 (1978)

Holstein A.F.:
Morphologische Studien am Nebenhoden des Menschen in:
Zwanglose Abhandlungen aus dem Gebiet der normalen und pathologischen Anatomie 20, 1 (1969)

Jensen E.V. und De Sombre E.R.:
Estrogen receptor interaction
Science 182: 126 - 135 (1973)

Kanka J. and Kopecny V.:
An Autoradiographic Study of Macromolecular Synthesis in the Epithelium of the Ductus Epididymidis in the Mouse. I. DNA, RNA and Protein.
Biol. Reprod. 16: 421 - 427 (1977)

Leav I., Merk F.B., Ofner P., Goodrich G., Kwan P.W.L., Stein B.M., Sar M., Stumpf W.E.:
Bipotentiality of response to sex hormones by the prostate of castrated and hypophysectomized dogs. Direct effects of estrogen.
Am. J. Pathol. 93: 69 - 92 (1978)

Liao S.:
Receptors and the mechanism of action of androgens. In: Receptors and mechanismens of action of steroid hormones. Part 1, Marcel Dekker, Inc. New York: 159 - 214; Hrs.: J. R. Pasqualini (1976)

Lyon M.F.:
Gene action in the X-chromosome of the mouse (mus musculus L.)
Nature (Lond.) 190: 372 - 373 (1961)

Lyon M.F., Hawkes S.G.:
X-linked gene for testicular feminization in the mouse. Nature (Lond.) 227: 1217 - 1219 (1970)

Merk F.B., Leav, I. Kwan P.W.L., Ofner P.:
Effects of estrogen and androgen on the ultrastructure of secretory graunles an intercellular junctions in regressed canine prostate. Anat. Rec. 197: 111 - 132 (1980)

Moore H.D.M and Bedford J.M.:
Short-term Effects of Androgen Withdrawal on the Structure of Different Epithelial Cells in the Rat Epididymis. Anat. Rec. 193: 293 - 312 (1979a)

Moore H.D.M., Bedfort J.M.:
The differential absorptive activity of epithelial cells of the rat epididymis before and after castration. Anat. Rec. 193: 313 - 328 (1979b)

Nicander L.:
On the regional histology and cytochemistry of the ductus epididymidis in rabbits. Acta morphol. neerl.-scand. 1: 99 - 118 (1957)

Nicander L.:
Studies on the regional histology and cytochemistry of the ductus epididymidis in stallions, rams and bulls. Acta morphol. neerl.-scand 1: 337 - 362 (1958)

Pavlok A.:
Development of the penetration activity of the mouse epididymal spermatozoa in vivo and in vitro. J. Reprod. Fert. 36: 203 - 205 (1974)

Pujol A. and Bayard F.:
Androgen receptors in the rat epididymis an their hormonal control. J. Reprod. Fert. 56: 217 - 222 (1979)

Reid B.I. und Cleland K.W.:
The structure and function of the epididymis. I. The histology of the rat epididymis. Aust. J. Zool. 5: 223 - 246 (1957)

Sar M., Liao S., Stumpf W.E.:
Nuclear concentration of androgens in seminal vesicles and prostate demonstrated by dry - mount autoradiography. Endocrinology 86: 1008 - 1011 (1970)

Sheridan P.J., Buchanan J.M., Anselmo V.:
Autoradiography an biochemical studies of hormone lokalisation. The J. of histochem. and cytochem. 29, 1A: 195 - 200 (1981)

Soranzo L., Dadoune, J.-P., Fain-Maurel M.-A.:
La segmentation du canal epididymaire chez les souris: Etude ultrastructurelle. Reprod. Nutr. Develop 22 (6): 999 - 1012 (1982)

Stumpf W. and Sar M.:
Autoradiographic Techniques for Localizing of Steroid Hormones. Meth. of Enzymology Vol. XXXVI, Acad Press, New York,: 135 - 156; Herausgeber: O'Malley B.W., Hardmann J.G. (1975)

Stumpf W.E., Narbaitz R., Sar M.:
Estrogen receptors in fetal mouse. J. Steroid Bochem. 12: 55 - 64 (1980)

Stumpf W.E., Sar M.:
Autoradiographic localization estrogen, androgen, progestin and glucocorticosteroid in "target tissues" and "non target tissues" in: receptors and mechanismen of action of steroid hormones. Part I, Marcel Dekker, Inc. New York: 41 - 84;
Hrs.: J. R. Pasqualini (1976)

Tindall D.J., French F.S., Nayfeh S.N.:
Androgen uptake and binding in rat epididymal nuclei in vivo. Biochem. Biophys. Res. Comm. 49/6: 1391 - 1297 (1972)

Tindall I.J., Hansson V., Sar M., Stumpf W.E., French F.S. Nayfeh S.N.:
Further studies on the accumulation and binding of androgen in rat epididymis. Endrcrinology 95: 1119 - 1128 (1974)

Tindall D.J. French F.S. and Nayfeh S.N.:
Estradiol-17β inhibition of androgen uptake, metabolism and binding in epididymis of adult male rats in vivo: a comparison with cyproterone acetate. Steroids 37 (3): 2706 - 2717 (1981)

Wilson E.M. and French F.S.:
Binding properties of androgen receptors: evidence for identical receptors in rat testis, epididymis, and prostate. J. Biol. Chem 251: 5620 - 5629 (1976)

Young W.C.:
Die Resorption in den Ductuli efferentes der Maus und ihre Bedeutung für das Problem der Unterbindung im Hoden-Nebenhodensystem. Z. Zellforsch. 17: 729 - 759 (1933)

LEBENSLAUF

Am 24. Juli 1958 wurde ich, Gunter Schleicher, als 2. Sohn des Hermann und der Maria Schleicher, geborene Göpfert, in Stuttgart geboren.
Von April 1965 bis August 1968 besuchte ich die Grundschule in Stuttgart-Hofen. Anschließend trat ich in das Johannes Kepler-Gymnasium in Stuttgart-Bad Cannstatt ein, wo ich im Mai 1977 das Abitur ablegte.
Ich begann im Oktober 1977 mit dem Medizinstudium an der Universität Stuttgart-Hohenheim und wechselte nach zwei Semestern an die Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
Seit 1977 bin ich Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes.
Im August 1979 legte ich die ärztliche Vorprüfung in Reutlingen ab. Im gleichen Sommer begann ich am Anatomischen Institut unter der Leitung von Herrn Prof. Drews gemeinsam mit Herrn Thiedemann eine Forschungsarbeit über die androgenabhängige RNA-Synthese im quergestreiften Urethalmuskel der Maus, die 1980 publiziert wurde. Anschließend beschäftigte ich mich mit der autoradiographischen Darstellung der Dihydrotestosteron-Bindung in diesem Organ. Von Januar bis April 1982 arbeitete ich im Labor von Prof. Stumpf an der Universität von N. Carolina in Chapel Hill/USA. Ich führte dort Experimente zum autoradiographischen Nachweis der Dihydrotesteron- und Östradiolbindung in den Sexualorganen und dem Gehirn adulter Tiere und Embryonen durch. Die Versuchsergebnisse im Nebenhoden verwendete ich zu dieser Dissertation.
Im August 1980 legte ich in Reutlingen den 1. Teil des medizinischen Staatsexamens, im August 1982 in Tübingen den 2. Teil des medizinischen Staatsexamens ab. Im Oktober 1982 begann ich am Stuttgarter Katharinen-Hospital mit dem praktischen Jahr. Am Stuttgarter Olga-Hospital erfolgte meine Ausbildung im Wahlfach Kinderheilkunde.
Ich bestand den 3. Teil des medizinischen Staatsexamens am 17. Oktober 1983.